Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. E. Bock

Polarisationsoptische Untersuchungen über die Beziehungen zwischen den Bausteinen der Grundsubstanz und den kollagenen Fasern

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Brigitte Strohmaier
aus Reutlingen

1964

8060

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547602_0078

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. E. Bock

Polarisationsoptische Untersuchungen über die Beziehungen zwischen den Bausteinen der Grundsubstanz und den kollagenen Fasern

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Brigitte Strohmaier
aus Reutlingen

Dekan: Professor Dr. H. H a r m s

1. Berichterstatter: Dozent Dr. H.P. M i s s m a h l

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.E. B o c k

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Herrn Oberarzt Dozent Dr. M i s s m a h l
danke ich verbindlichst für die Überlassung des Themas und für die mir jederzeit geleistete freundliche Unterstützung.

Inhalt

I. Literaturübersicht

	Seite
Die kollagenen Fasern	6
1.) Vorkommen und Entstehung	6
2.) Struktur	9
3.) Eigenschaften	12
4.) Kollagen- seine Beziehungen zum Altern und zu den sogenannten Kollagenkrankheiten	15
Die mesenchymale Grundsubstanz	16
1.) Vorkommen und Entstehung	17
2.) Chemische Zusammensetzung	18
3.) Eigenschaften	19
4.) Funktion	20
5.) Nachweisreaktionen	20
6.) Stoffwechsel und Stoffwechselstörungen .	21
7.) Die wesentlichen Bestandteile der Grundsubstanz	22
a. Heparin	22
b. Chondroitinschwefelsäure	26
c. Hyaluronidase	28

II. Eigene Untersuchungen

Material und Methode	30
Reagentien	33
Beitrag zur Polarisationsoptik	34
Ergebnisse	37
1.) Das Verhalten der Phenolreaktion unter dem Einfluss von Hyaluronidase, Heparin und Chondroitinsulfat	37
2.) Der Einfluss von SP 54^{R} auf die Phenolreaktion	38

Seite

3.) Die Phenolreaktion am Prokollagen 39
4.) Besonderheit bei der Phenolreaktion . . . 39
5.) Die Phenolreaktion an Schnitten unfixierter Häute 39
6.) Färbung des kollagenen Gewebes mit Rivanol 39
7.) Verhalten der kollagenen Fasern nach Anfärben mit Toluidinblau 49

Diskussion der Ergebnisse 49
Reaktionen zwischen Grundsubstanz und den kollagenen Fasern 54

Zusammenfassung 65

Literaturverzeichnis 68

Im kollagenen Bindegewebe sind die Fasern in die sie umgebende Grundsubstanz eingelagert. Dabei wissen wir bis heute nur wenig über die strukturellen und chemischen Beziehungen zwischen diesen beiden Anteilen. Dies gilt nicht nur für das normale, sondern in noch höherem Masse für krankhaft verändertes kollagenes Bindegewebe. Aus diesen Gründen stellten wir die Frage, inwieweit durch polarisationsoptische Untersuchungen und insbesondere durch eine quantitative Auswertung der v. EBNERschen Phenolreaktion (MISSMAHL und BETZ[10]; MISSMAHL[66]) weitere Aufschlüsse über die Beziehungen zwischen diesen beiden Anteilen des Bindegewebes zu erhalten sind. Wesentliche Voraussetzung hierzu ist die Kenntnis des Aufbaues und der Entwicklung jedes dieser Bestandteile des kollagenen Bindegewebes.

Die kollagenen Fasern.

1.) Vorkommen und Entstehung

Die kollagenen Fasern sind der weitest verbreitete Bestandteil des Körpers. Sie bilden den Hauptanteil der geformten Interzellularsubstanz und kommen vor allem in der Haut, den Knochen, Sehnen und Faszien, sowie im lockeren und festen Bindegewebe vor. Wahrscheinlich besteht das Kollagen trotz seiner grundlegenden gemeinsamen chemischen und strukturellen Charakteristika nicht in allen Geweben aus genau gleicher Substanz(WASSERMANN[108]). Von medizinischen Gesichtspunkten her spielt das Kollagen eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen, Neoplasmen, Störungen des Vitaminhaushaltes, hormonellen Gleichgewichtsstörungen und in den allgemeinen Systemkrankheiten, die das Bindegewebe diffus oder entzündlich angreifen.

Über die Fibro- und Fibrillogenese und deren räumliche Zusammenhänge haben schon viele Autoren berichtet. Ursprungsort der Fasern sind die Fibroblasten. WASSERMANN[108] gibt eine umfassende Darstellung über die Entstehung der Primär-

fibrillen. Hiernach werden sie intraplasmatisch aus einer Serie von aneinandergereihten Granula gebildet.

Auch JACKSON[42] beschreibt die fibrogenetischen Eigenschaften der Cytoplasmagranula, die Protein und Mucopolysaccharide enthalten und an der Bildung des interzellulären Materials beteiligt sind. Die Filamente liegen zunächst innerhalb des Cytoplasmas oder sind zumindest damit verbunden. Mit dem Reifen des Bindegewebes erscheinen Interzellularräume, die sich mit Fibrillen und Fibrillenbündeln anfüllen. Neben dieser intrazellulären Faserbildung findet man auch eine extrazelluläre. PORTER[79] beschreibt 1952 eine Fibrillogenese an der Zelloberfläche und zwar durch Organisation des Ektoplasmas. Dieser Annahme widerspricht allerdings die Faserbildung induzierende Wirkung des Heparins(MORRIONE[68])

WASSERMANN[109] erwähnt 1929, dass Primärfibrillen ohne Zellbeteiligung direkt aus der Grundsubstanz entstehen können. Er bezeichnet dies als die Stufenfolge der Bindegewebsentwicklung. Für den Beginn der Fibroblastenaktivität scheint - ausser Vitamin C - die Hinderung der Zellteilung verantwortlich zu sein. Möglicherweise hemmen grosse Mucopolysaccharidmengen die Fibroplasie. Eine starke Grundsubstanzbildung ruft eine Dispersion von Prokollagen hervor und induziert dadurch die Primärfaserbildung an der Zelloberfläche.

Dass die Zellgranula an der Fibrogenese beteiligt sind, zeigt RANDALL[81] an der komplexen Struktur der Granula, die sich für Proteine charakteristisch färben.

NEMETH-CSOKA[71] beschreibt bei Präzipitation mit Chondroitinschwefelsäure eine Abhängigkeit der Faserbildung von dem Polymerisationsgrad dieser Säure, und zwar entstehen um so mehr Fasern, je höher dieser ist.

Alle diese Möglichkeiten einer geordneten Strukturbildung setzen aber voraus, dass zwischen den hieran beteiligten Molekülen richtunggebende Kräfte wirken. Hierfür kommen neben anderen die van der Waalschen Kräfte in Frage (RANDALL[81]). Wirken die intermolekularen Kräfte statistisch ungeordnet, so kann keine entsprechende Struktur aufgebaut werden.

Eine Entstehung von kollagenen Fibrillen aus globularen Teilchen ist noch umstritten (FREY-WYSSLING[20]). Es können zwar heute globulare und fibrilläre Eiweisstoffe zum Teil reversibel ineinander übergeführt werden. Die Möglichkeit der Fibrillenbildung setzt allerdings voraus, dass die globularen Eiweissteilchen zwei Pole besitzen, die eine Linearaggregation ermöglichen.

Im jungen wachsenden Bindegewebe gibt es Fadenmoleküle mit vielen ionischen Gruppen. Deren Gehalt nimmt später ab (THIELE[103]). THIELE sieht in der Ionendiffusion bei Fadenmolekülen ein allgemeines ordnendes Prinzip für das Wachstum von Geweben. Er machte Versuche, bei denen er in Gele aus Fadenmolekülen verschiedene Ionen einwandern liess. Hieraus ergab sich, dass das zunächst ungeordnete Gel Feinstrukturen annahm, welche denen natürlicher Gewebe weitgehend gleich sind. Entscheidend für die Anordnung der entstandenen Feinstruktur waren dabei die Ladungen der ionischen Gruppen an den Fadenmolekülen.

HIGHBERGER[35] fand in der Haut eine leicht lösliche Kollagenart, die mit alkalischem Puffer zu extrahieren ist. Es wurde vermutet, dass sie ein direkter Vorläufer des reifen Kollagens sei; man nennt diese alkalilösliches Kollagen.

Prokollagen, das nach GRASSMANN[26] aus feinen, gleichartigen, spitz zulaufenden Fäserchen besteht, zeigt elektronenoptisch eine gegenüber reifem Kollagen weniger dichte, aber typische Querstreifung. ORECHOWITSCH[74] verstand unter Prokollagen die sonst als Tropokollagen bezeichnete lösliche Kollagenvorstufe. Dieses kann mit verdünnter Säure aus kollagenen Fibrillen extrahiert werden, und zwar bei Jugendlichen bis 10% des Trockengewichtes; ältere Gewebe enthalten weniger. LINDNER[56] hält das Prokollagen für ein Reaktionsprodukt von Kollagen und nicht unbedingt für eine Vorstufe desselben. Er lässt auch die Frage offen, ob fertiges Kollagen, Prokollagen und Tropokollagen in der lebenden Faser wirklich so vorhanden sind, weil sie ja erst durch Aufarbeitung der nativen Faser gewonnen werden.

Teilweise werden die retikulären Fasern auch als pro-

kollagene Fasern bezeichnet, die noch eine wenig differenzierte Struktur aufweisen (GESCHICKTER und Mitarb.[23]).

Die Histologen bezeichnen als Präkollagen alle Jugendformen der kollagenen Fibrillen. Diese sind dünner als reife Fasern und färben sich bei Silberimprägnierung dunkler (GÖMÖRI 1937[25]).

2.) Struktur

Die kollagene Faser besteht nach polarisationsoptischen Untersuchungen aus zwei Komponenten (WASSERMANN[108]; BANGA,BALO,SZABO[7]) :

1. aus streng orientierten Teilen
2. aus einem Medium, das einen andern Brechungsindex aufweist.

Die kollagenen Protofibrillen sind aus linearorientierten, polymerisierten Polypeptiden aufgebaut. Durch ihre periodische Querstreifung von 640 Å unterscheiden sie sich von den übrigen fibrillären Proteinen. Diese Querstreifung ist 20 mal feiner als die der Muskulatur (WOLPERS[117]). Die 640 Å-Periode fehlt den jungen kollagenen Fasern noch, bzw. sie besitzen nur eine kürzere Querstreifung. Die periodische Querstreifung besteht aus dem hellen H-Teil und dem dunklen D-Teil, in dem die Polypeptidketten dichter gepackt sind. Bei Dehnung der kollagenen Fibrillen wird der H-Abschnitt länger und dünner(FREY-WYSSLING[20]). Ihre Darstellung hängt von dem Vorhandensein oder Fehlen stärkerer Schichten der Grundsubstanz ab, da diese die Querstreifung verdecken können.

Man kann die Grundsubstanzhülle um die Fasern mit Ultraschall beseitigen, wobei Zellen und Grundsubstanz zerstört werden, die zugfesten kollagenen Fasern aber erhalten bleiben (WOLPERS[117]).

REED[84] und BEAR[8] geben eine genaue Beschreibung der einzelnen Strukturen, welche die kollagene Faser zusammensetzen : eine Fibrille besteht aus 2 Filamentsätzen, die

sich spiralig überkreuzen. Jedes Filament setzt sich wiederum aus Protofibrillen zusammen. Sie zeigen ebenfalls die 640 Å-Periode und bestehen aus einer Spiralstruktur von 3 Polypeptidketten. NORTH[73] u.a. betrachten die Protofibrillen ebenfalls als Untereinheit der Faser.

VERZAR[107] beschreibt an Sehnenfasern mikroskopisch im auffallenden Licht eine Spiralstruktur. Diese fehlt den elastischen Fasern. Thermisch kontrahierte Fasern verlieren sie ebenfalls und werden gummi-elastisch (BAHR[5]).

Nach PAULING und COREY[76) 77] sind die Polypeptidketten der Protofibrillen als Helix um eine gemeinsame Achse gewunden. Es kommen dabei gleiche Aminosäure-Reste auf die gleiche Ebene jeder Kette; das α- C-Atom der 3 Reste liegt an den Ecken eines gleichseitigen Dreiecks, senkrecht zur Fibrillenachse. Diese Dreiecke kommen regelmässig entlang der Achse vor, nur um 40° gedreht. Die Seitenlänge des Dreiecks beträgt 5 Å. Eine Kette liegt nahe der Mitte der Struktur, die beiden andern sind ausserhalb. Jedes dritte N-H kann eine stereochemisch passende H-Brücke mit jedem dritten C=O der Nachbarkette bilden. So entstehen aus den zwischen den Ketten liegenden H-Brücken die Seiten eines gleichseitigen Dreiecks.

Man kennt drei Modelle für die Kollagenstruktur:

1. Von PAULING und COREY 1951
2. Von RAMACHANDRAN und KARTHA 1955
3. Von RICH und CRICK 1955

Nach HARRINGTON[32] ist Kollagen II das am besten anwendbare Modell für die Konfiguration der Polypeptidketten in der kollagenen Faser. Hierbei liegen 2 Ketten in einer Ebene, die dritte Kette liegt davor. (Im Gegensatz dazu steht bei Kollagen I die dritte Kette hinter den beiden andern).

Damit ist die kollagene Faser also eine 3er-Kette mit einer Superhelixstruktur, die durch H-Brücken zwischen den Peptiden stabilisiert ist. BAHR[5] zeigte 1952, dass die Kollagenfibrillen elektronenoptisch 3 Unterbänder mit verschiedener Dichte und einer Länge von 210 Å besitzen. Er schliesst daraus, dass die Moleküle entlang ihrer Achse

verschiedene Dichten aufweisen oder dass drei verschiedene Moleküle vorhanden sind, und zwar in linearer Aggregation.

Die Polypeptidketten sind ziemlich locker orientiert. Der Abstand zwischen den einzelnen Faserachsen beträgt 2,86 Å. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Amidgruppen der Polypeptidketten in Cis-Konfiguration stehen (PAULING und COREY[76] [77]).

Aus der Struktur der kollagenen Fibrille erklärt sich deren begrenzte Dehnbarkeit. Eine maximale Längenausdehnung entspricht einer 10%igen Streckung des Moleküls.

NECKEL und KRÜGER[70] sind der Ansicht, dass sich in den Kollagenfibrillen gestreckte Polypeptidketten zusammenlegen. Für das Vorkommen von Fadenmolekülen spricht auch die starke Strömungsdoppelbrechung der Kollagenlösungen; diese sind keine Sole, sondern Gele, bei denen die Abstände der Polypeptide durch Hydratation vergrössert sind.

Die Schraubentheorie vom Aufbau der Polypeptidketten scheint richtig zu sein. Dabei besteht ein Kabel aus einem Zentralstrang und 6 Mantelsträngen. In den Zwischenräumen zwischen mehreren Kabeln kann ein weiterer Typ einer Schraubenkette vorkommen. Die Moleküle werden nach FREY-WYSSLING[20] durch zwei verschiedene Kräfte zusammengehalten: Nah- und Fernkräfte (short und long range forces mit 1 bis 10 Å und 100 Å Teilchenabstand). Sie wirken als Kohäsionskräfte und sind Erscheinungen der Ladung und der Dipolinduktion durch elektrische Felder (van der Waalsche Kräfte).

Bei der Reaktion zweier Atome miteinander entsteht ein Dipol aus positivem und negativem Atom. Je grösser das Dipolmoment, desto grösser sind die Kohäsionskräfte. Die H-Bindung ist eine Folge der grossen Dipolmomente der OH- und NH-Gruppen. So ist z.B. ein Teil der OH-Gruppen von Oxy-Prolin durch ein H-Atom an die Keto- Imidgruppe gebunden (Abb. 1). Die Hydroxyprolingruppe ist damit wichtig für die Stabilisierung der Kollagenstruktur, insbesondere was deren Wasser- und Wärmestabilität anbelangt.

Nach NEMETH-CSOKA[72] hängt die Dicke der Fasern von der Polymerität der ausgefällten Chondroitinschwefelsäure ab.

Je höher diese ist, desto dicker sind die Fasern.

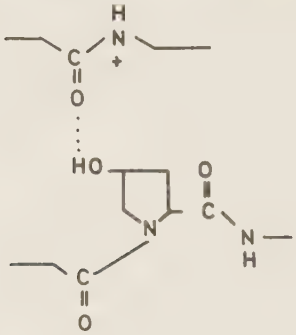

Abb. 1 : Bindung von Oxyprolin an die Keto-Imid-Gruppe.

LINDNER[56] und GUSTAVSON[30] unterscheiden 3 Arten von Bindungen zwischen den elementaren Einheiten der kollagenen Faser:

1. Die Ionenbindung als salzähnliche Querverbindung zwischen entgegengesetzt geladenen langen Seitenketten,
2. H-Brücken als nicht ionische Querverbindungen,
3. van der Waalsche Kräfte.

3.) Eigenschaften

Kollagenfaserproteine zeigen keine Dehnbarkeit, sondern nur eine Superkontraktion. Deren Ursache ist darin zu suchen, dass die Polypeptidketten frei um ihre Achse drehbar sind und sie nicht in einem dreidimensionalen Gitter vorliegen (FREY-WYSSLING[20]).Durch Säurezusatz werden die Seitengruppen der Proteinketten mit H^+ beladen. Die restlichen negativen Ladungen bewirken ein osmotisches Anschwellen, was eine Kontraktion zur Folge hat. Die Kollagenfasern kontrahieren sich bei Hitzeeinwirkung (BEAR[8]; VERZAR[107] und BANGA, BALO, SZABO[6]). Durch diese Thermokontraktion wird die Faser in einen dem Elastin entsprechenden Zustand versetzt. Dabei werden bei 70° C Dicarboxy-Aminosäuren abgespalten.Die kollagene Faser kann in

diesem Zustand von Elastase angegriffen werden. Sehnen gehen so z.B. durch Thermokontraktion in einen dehnbaren Zustand über, der bei alten Tieren höher ist. Die Spiralstruktur wird dabei aufgehoben (LINDNER[54]). Diese thermische Beeinflussung kann man sich damit erklären, dass durch Wärme ein Faktor gehemmt oder zerstört wird, der normalerweise im Leben eine Verkürzung verhindert (VERZAR[107]).

Nach LINDNER[54] kommt es intravital nur sehr selten zu einer Dehnung der intramolekularen Bindungen der Polypeptidketten der Kollagenfasern, also der H-Brücken und der van der Waalschen Kräfte. Die Ursache liegt darin, dass schon vorher eine irreversible Störung der Kittsubstanz-Faser- Beziehungen auftritt.

Eine ähnliche Beeinflussung von Kontraktion und Erschlaffung kollagener Fasern kann man mit konzentrierten Salzlösungen bei Raumtemperatur erreichen (BANGA,BALO, SZABO[6]).

Beim Trocknen treten nach LINDNER[56] infolge von Kontraktionsvorgängen dunkle, schraubenförmig verlaufende Querbanden auf, die bei der frischen Faser nicht anzutreffen sind.

Kollagene Fasern sind positiv doppelbrechend. Ihre Doppelbrechung beruht auf einer gitterartigen Anordnung anisodiametrisch gelagerter Teilchen. WASSERMANN[108] zeigt am Beispiel von Gelatine, dass dann Doppelbrechung entsteht, wenn man isotropes Material, das asymmetrische Teilchen enthält, streckt. Das interzellulare Medium enthält solche Teilchen, die in Richtung einer äusseren Kraft orientiert werden können.

Bei Lufttrocknung nimmt die Doppelbrechung sowohl in jungen als auch in alten Fasergeweben ab. Junges Gewebe hat wegen seiner maximalen Wasseranlagerung eine höhere Doppelbrechung. Das Wasser ist fest mit Struktur und Stabilität von Kollagen verwickelt. Durch Dehydratation wird z.B. das Röntgenmuster weitgehend zerstört; es kann durch Anfeuchten wieder hergestellt werden. Die stabilisierende Rolle des Wassers geht über 2 H-Brücken (Abb. 2).

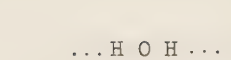

Abb. 2. Wasserstoffbrücken (HARRINGTON[32])

THIELE u.Mitarb.[103) 105)] beobachteten die Ordnung von Fadenmolekülen an einer Gelmembran, und zwar senkrecht zum Ionenstrom. Dieses ionotrope Gel war doppelbrechend. Die Ionendiffusion bei Polypeptidketten führt zu Strukturbildung. Der Grad der Ordnung kann an der Stärke der Doppelbrechung beobachtet werden. Die von THIELE beobachtete Ionotropie ist eines der in der Natur wirksamen Ordnungsprinzipien. Man kann mit ihrer Hilfe makromolekulare Stoffe nachbilden. In der Natur ist die Ionendiffusion ein ständig ablaufender Vorgang, bei dem auch Potentiale und elektrische Felder entstehen (LANGE, PLOHNKE[48)]). Die Polyelektrolyte stellen sich parallel zu den Äquipotentialflächen des elektrischen Feldes ein und werden so orientiert. Als ordnendes Prinzip wirkt vor allem das Diffusionspotential.

Die kollagenen Fasern sind sehr enzymresistent. Sie können fermentativ jedoch von Kollagenasen angegriffen werden. THONARD und SCHERP[106)] stellten fest, dass Mikroorganismen in der Gingiva oder in periodontalen Taschen Kollagenasen produzieren, die zum Zusammenbruch des hier vorkommenden Kollagens führen. Wahrscheinlich ist der Verlust der Fasern aber keine primäre Wirkung der mikrobiologischen Kollagenase, sondern beruht auf einer Veränderung des Kollagens, durch die es dann andern proteolytischen Fermenten zugänglich ist.

Über die Anlagerung von Formalin an die kollagene Faser bei der Fixierung sei auf die Arbeiten von FREY-WYSSLING[20)] und BETZ[10)] verwiesen.

Die Färbbarkeit des fixierten Eiweissgerüstes mit sauren und basischen Farbstoffen ist verändert, denn die Lage des isoelektrischen Punktes der Plasmaproteine hängt von den Eigenschaften des Fixationsbades ab. Durch die Abschirmung basischer Gruppen werden die anionischen Eigenschaften der Plasmaeiweisskörper verstärkt.

Aus kalten Neutralsalzextrakten von löslichem Kollagen kann durch Erwärmen auf 37° C ein undurchsichtiges Gel aus quergestreiften Fibrillen ausgefällt werden und entsprechend durch Abkühlung wieder gelöst. Mit einer Steigerung der Wärmeeinwirkung nimmt auch die Irreversibilität zu, d.h. je länger die Wärme einwirkt, desto weniger gehen die Fasern beim Abkühlen wieder in Lösung. Dies lässt sich mit Hilfe der Braunschen Molekularbewegung erklären, die den assoziierten Molekülen erlaubt, die stabilsten und räumlich passendsten Stellungen zu finden, indem sie mehrere intramolekulare Querverbindungen einrichten. Hieraus werden vielleicht auch die Struktur- und Funktionsveränderungen des Organismus mit zunehmendem Alter verständlich, weil hier ja die biologischen Hochpolymere lange Zeit assoziiert sind (GROSS[28]).

4.) Kollagen - seine Beziehungen zum Altern und zu den sogenannten Kollagenkrankheiten

Mit dem Altern gehen an der kollagenen Faser verschiedene Prozesse einher (VERZAR[107]) :

1. Die Thermokontraktion wird immer grösser und sie bleibt auch dann bei wieder sinkender Temperatur konstant,
2. bei alten Sehnenfäden muss die Thermokontraktion mit schwereren Gewichten gehemmt werden als bei jungen,
3. bei Erwärmung geht die Faser vom gestreckten unelastischen Zustand in einen verkürzten elastischen über. Aus dieser Überlegung heraus soll in den Sehnen des alten Tieres 10 mal mehr Arbeit geleistet werden (VERZAR[107]).

Nach GUSTAVSON[30] ist mit dem Altern und mit gewissen pathologischen Bedingungen eine Änderung des Kollagens verbunden, die mit einer Bildung und Bindung von Aldehyden einhergeht.

Mit dem Altern nimmt die Zusammensetzung der Kittsubstanz ab (WASSERMANN[110]). Die Tatsache, dass sich der Durchmesser der kollagenen Fasern mit dem Alter verändert, hat zu der Schlussfolgerung geführt, dass das interfibrilläre Material Kollagenmoleküle enthalten muss, die sich bei fortschreitendem Wachstum an die Faser anlagern. Dies unterstützt die Vermutung mancher Autoren, dass durch Neutralsalzextraktion das Material in die Grundsubstanz des Bindegewebes verteilt wird und so ein Vorläufer der Fibrillogenese ist.

Mit der Perjodat-Silberurotropin-Reaktion konnten KÜHN, HOFMANN, GRASSMANN[45] zeigen, dass sich die Silbereinlagerung bei Embryonen besonders in der amorphen Grundsubstanz bemerkbar macht. Mit zunehmendem Alter lagert sich das Silber zunächst an die Faseroberfläche an, dann immer mehr ins Innere der Fibrillen. Hier wirft sich die Frage auf, ob sich die Kohlehydrat-Komponente der Faser, an der die Silberreaktion vor allem abläuft, im Lauf der Entwicklung immer mehr ins Innere verlagert. Damit kann man dann einen Zusammenhang suchen zwischen kohlehydrathaltigen Gruppierungen und der Bildung, Differenzierung und Reifung kollagener Fibrillen.

Die oben erwähnten Autoren wiesen nach, dass die für eine periodische Silberablagerung verantwortlichen Gruppierungen von Hyaluronidase nicht angegriffen werden. Sie müssen also fest mit der Faser verbunden sein.

Für die Kollagenkrankheiten haben GESCHICKTER u. Mitarb.[23] einige gemeinsame histopathologische Züge dargestellt:

1. Die schleimige Degeneration der Bindegewebsgrundsubstanz,
2. eine Vasculitis mittlerer und kleiner Gefässe,
3. lokale histologische Veränderungen bei den einzelnen Krankheitsbildern.

Die mesenchymale Grundsubstanz

Der Ausdruck "Grundsubstanz" wurde im Jahre 1836 von

MECKAUER[59] eingeführt. Unter diesem Namen versteht man den amorph erscheinenden strukturlosen Anteil des Bindegewebes. Da die Grundsubstanz enzymatisch und hormonell beeinflusst werden kann, ist sie nicht nur eine leblose Kitt- und Füllmasse. Sie zeigt eine eigene Dynamik und nimmt am physiologischen und pathologischen Geschehen der lebenden Substanz teil, wie dies z.B. KEINING und BRAUN-FALCO[43] an der Haut beschreiben. Die makromolekulare Natur der Grundsubstanz-Mucopolysaccharide und ihr natürliches Vorkommen als Proteinkomplexe lassen die Vermutung aufkommen, dass diese Substanzen nicht aus dem Bindegewebe diffundieren, sondern von zellulären Elementen desselben aufgebaut werden (HIGGINBOTHAM)[33].

1.) Vorkommen und Entstehung

Die Grundsubstanz kommt überall vor, wo Bindegewebe und Fasern anzutreffen sind (POLICARD[78]). In der Haut bildet sie in der pars reticularis und papillaris und in der Basalmembran eine zusammenhängende Schicht (RIZZOLI[86]). Dies bedingt eine Erleichterung des Stoffaustausches zwischen Epidermis und Dermis. Durch ihre Anordnung zeigt sie ihre Aufgabe als Schutzfunktion. Insgesamt ist sie einheitlich, hat aber dennoch regionale Verschiedenheiten. In ihrer Funktion zeigt die Grundsubstanz Einheitlichkeit: jedes Individuum hat z.B. ein ihm eigenes konstitutionsbedingtes Ausmass an Permeabilität und Tonus der Grundsubstanz (DURAN-REYNALS[17]).

Die Bildungsstätte der Grundsubstanz sind die Fibroblasten, in deren Zytoplasma metachromatische Granula nachgewiesen werden konnten. Sie sind Ausdruck für sulfatierte Mucopolysaccharide, dem Hauptbestandteil der Grundsubstanz (s.u.)(WASSERMANN[110], BUNTING[11]).

Auch GROSSFELD,MEYER,GODMAN,LINKER[29] zeigten 1955, dass Mucopolysaccharide von Fibroblasten produziert werden. Die Herkunft der Grundsubstanz aus Mastzellen ist nicht gesichert. Nach BUNTING und WHITE[12] sind diese zur Bindegewebsbildung nicht notwendig; nach der Ansicht von ASBOE-HANSEN

dagegen sind sie an der Grundsubstanzbildung beteiligt. WASSERMANN[109] beschrieb 1929 eine direkte Umwandlung des Fibroblasten- oder Chondroblastenektoplasmas in Grundsubstanz.

Junges Gewebe ist weniger orientiert und enthält viel mehr nicht orientierte Intermicellarsubstanz als altes.

Nach NEMETH-CSOKA[71] sind die sauren Mucopolysaccharide, die bisher als amorphe Grundsubstanzkomponente zwischen den Fasern bzw. Filamenten angesehen wurden, orientiert in das submikroskopische Strukturgefüge eingebaut. Er glaubt dies damit beweisen zu können, dass die kollagenen Fasern bei Färbung mit basischen Akridinfarbstoffen (Rivanol) auch unter pH 4 anisotrope Färbung, nämlich negative Doppelbrechung zeigen. Dies soll auf orientiert eingelagerte Strukturbestandteile saurer Beschaffenheit hinweisen. NEMETH-CSOKA erklärt diese Adsorption damit, dass die fibrilläre Eiweisskomponente sozusagen orientierend-konjugierend auf die fibrilläre Ausfällung der sauren Mucopolysaccharide einwirkt, da diese keine spontane Tendenz zur Präzipitation zeigen. Wir konnten diese Ergebnisse von NEMETH-CSOKA nicht bestätigen, worauf wir noch eingehen werden.

2.) Chemische Zusammensetzung der Grundsubstanz

Chemisch enthält die Grundsubstanz fast alles extrazelluläre Wasser. Ausserdem:

Mucopolysaccharidsäuren
Plasmaeiweiss
"Prokollagen"
niedrigmolekulare Blutbestandteile als Ultrafiltrat

Die wichtigsten Vertreter der Mucopolysaccharide sind:

Hyaluronsäure
Hyaluronschwefelsäure
Chondroitinschwefelsäure A,B und C.

Allen gemeinsam ist die kettenförmige Struktur aus glykosidisch verknüpften Grundeinheiten, die selbst wieder

Saccharide der angegebenen Zusammensetzung sind: Hexosamin und Uronsäure, evtl. noch ein Acetyl- oder Sulfatrest. Die Haut enthält z.B. nur Hyaluronsäure und Chondroitinschwefelsäure B, ganz wenig A und C. Geschlecht und Alter haben keinen Einfluss auf die Verteilung in der Haut (RIZZOLI[86]). Das Molekulargewicht liegt bei den einzelnen Mucopolysacchariden verschieden: von 1-100 mal 10^4.

Die Grundsubstanz ist kein einfacher Faserfilz, sondern zwischen den solitären Fibrillen ist immer noch amorphe Grundsubstanz, in der ganz feine,noch nicht definierbare Strukturen vorhanden sind, also ein amikroskopisches Gitter von Fadenmolekülen. In der kontinuierlichen Grundsubstanz bestehen flüssigere und festere Phasen nebeneinander (WASSERMANN[110]).

3.) Eigenschaften (WASSERMANN[108], DURAN-REYNALS[17])

a. Die Grundsubstanz hat mucösen, gelatineartigen Charakter.

b. Im Elektronenmikroskop ist die Grundsubstanz nicht amorph, da sie mechanisch nicht von Fasermaterial getrennt werden kann.

c. In Wasser ist sie unlöslich. Infolge der hohen Wasserbindungsfähigkeit hat sie kolloidalen Charakter.

d. Die Wasserbindungs- und Quellkomponente des Bindegewebes scheint Hyaluronsäure zu sein, oder ein Abbauprodukt derselben. Die Vorgänge des Quellens und Schrumpfens sind reversibel, ohne dass irgendeine Desorganisation auftreten würde.

e. Im Alter nimmt die Wasserbindungsfähigkeit ab, ebenso Permeabilität und Metachromasie, was mit einer Abnahme der Grundsubstanz und einer entsprechenden Zunahme der Fasern im Alter zu erklären ist (BENSLEY[9]).

f. Die Basophilie ist bei niedrigem pH und bei Anwesenheit vieler Sulfatgruppen intensiver.

g. Mit Pankreatin und Trypsin kann Grundsubstanz angedaut werden.

h. Die Grundsubstanz zeigt keine Braunsche Molekularbewegung.

4.) Funktion

Die sauren Mucopolysaccharide spielen im Aufbau, der Entstehung und strukturellen Stabilität, und in der Gestaltung der physikochemischen Eigenschaften der kollagenen Fasern eine bedeutende Rolle (NEMETH-CSOKA[71]). Physiologisch ist die Grundsubstanz das Medium des extravaskulären Stofftransports zwischen Blut- und Lymphbahn und den Zellen (WASSERMANN[110]).

Die mechanische Funktion liegt in der Quellbarkeit, in Viskositäts- und Elastizitätsvorgängen. Die Speicherfunktion drückt sich in der Aufnahme des extrazellulären Wassers aus. Die Durchflutung der Gewebe, die man an den sogenannten bradytrophen Geweben besonders deutlich beobachten kann, hängt von der Art, Menge und Qualität der die Grundsubstanz zusammensetzenden Mucopolysaccharide ab. An kollagenen Fasern diffundieren die Substanzen entlang der Oberfläche. Als Mass der Diffusibilität der Grundsubstanz verwendet man z.B. das Spreading von Tusche. Die Schutzfunktion wirkt sich für nicht hyaluronidaseproduzierende Keime als Schranke aus.

5.) Nachweisreaktionen

Als spezifischen Nachweis für saure Mucopolysaccharide verwendet man die weiter unten beschriebene Metachromasie, oder die Eigenschaft der Basophilie, mit der man saure von neutralen Mucopolysacchariden unterscheiden kann. Die PAS-Reaktion ist unspezifisch und findet nur im Zusammenhang mit andern Reaktionen (Metachromasie) Anwendung. Da sie bei niedrig polymeren Gruppen mit erhöhter Anzahl der Endgruppen besser anspricht, tritt auf Hyaluronidasezusatz eine verstärkte Farbreaktion auf.

Die Radioautographie wird zum Nachweis der Biosynthese von schwefelsauren Mucopolysacchariden verwendet. Eine indirekte Methode beruht auf dem enzymatischen Abbau der Mucopolysaccharide mit Hyaluronidase. NEMETH-CSOKA[71] glaubt die mukoide Strukturkomponente mit der anisotropen Rivanolfärbung nachweisen zu können.

6.) Stoffwechsel und Stoffwechselstörungen

Da die Grundsubstanz alle Gewebe bis zu den kleinsten Bausteinen umgibt, muss jede Substanz beim Stoffaustausch durch sie hindurch: Die Substanz verändert dabei die Grundsubstanz oder sie wird von der Grundsubstanz verändert (DURAN-REYNALS[17]).

Entscheidend für die Funktionsfähigkeit und die strukturelle Beschaffenheit ist die Art und Menge der Mucopolysaccharide. Sie kann fermentativ und hormonell beeinflusst werden. Die Steuerung kann durch vermehrte und verminderte Fermentproduktion, durch Aktivatoren oder Inhibitoren erfolgen. Die Bindegewebszellen produzieren hyaluronidaseähnlich wirkende mukolytische Fermente im Gewebe. Das Ferment-Substrat-System bestimmt den physikalisch-chemischen Zustand der Grundsubstanz und damit auch die Wasserbindungsfähigkeit und die Permeabilität(WASSERMANN[110]).

Die hormonellen Einflüsse sind von einer quantitativen oder qualitativen Veränderung der Grundsubstanz begleitet. Je nach Hormon tritt Polymerisation (bei Östrogenen, Testosteron,TSH) oder Depolymerisation (bei Progesteron, Cortison) auf. Cortison hemmt z.B. die Sulfataufnahme in Chondroitinschwefelsäure; so kann man sich die osteoporotischen Vorgänge bei M.Cushing damit erklären, dass zu wenig chondroitinschwefelsäurehaltige Matrix produziert wird. In gleicher Weise kann man die Ursache für den Exophthalmus bei M.Basedow darin suchen, dass im Augenbindegewebe extrem vermehrt hyaluronidaseempfindliche Substanz vorkommt. Es soll sich dabei um einen peripheren Effekt des TSH handeln, das eine direkte Wirkung auf das Bindegewebe hat (ASBOE-HANSEN,IVERSEN[3]). Prätibiale Ödeme bei Myxödem enthalten viel homogene interfibrilläre Grundsubstanz: Hyaluronsäure und chondroitinschwefelsäureähnliche Mucopolysaccharide sind stark vermehrt. Eine Fibrosierung der Haut ist mit verminderter Konzentration der Mucopolysaccharide verbunden (WATSON, PEARCE[111]).

Auch Vitamine üben einen hemmenden oder fördernden Einfluss aus (GIBIAN[24]).

Bei Neoplasmen mesenchymaler Herkunft treten vermehrt Mucopolysaccharide auf (GIBIAN[24]).

Wachstum und Altern sind Folgen der gemeinsamen Wirkung hormoneller Steuerungsmechanismen. Im jungen wachsenden Gewebe (Embryo, Wundheilung, Tumor) tritt die amorphe Grundsubstanz in den Vordergrund. Im Alter wird sie von faserigen Strukturen verdrängt. Dies kann elektronenoptisch dargestellt werden: Die Kittsubstanz um die Fasern nimmt, metachromatisch sichtbar gemacht, mit dem Altern, das einem Reifen entspricht, ab.

Bei entzündlichen rheumatischen Erkrankungen treten auch Mucopolysaccharid-Stoffwechselstörungen auf; bei rheumatischer Arthritis ist z.B. die Hyaluronsäure qualitativ verändert und vermehrt.

Bei den sogenannten Kollagenosen sind hauptsächlich die Faseranteile betroffen, die Mucopolysaccharide spielen jedoch auch eine wichtige Rolle (GIBIAN[24]).

7.) Die wesentlichen Bestandteile der Grundsubstanz

a. Heparin

Vorkommen

Der Name "Heparin" stammt von der Entdeckung eines gerinnungshemmenden Stoffes aus Hundeleber. Es konnte in fast allen parenchymatösen Organen nachgewiesen werden und kommt auch z.B. in der Haut und in der Aortenwand vor. Da in Leber und Muskulatur (bei Tierversuchen) sehr viel Heparin vorhanden ist, glaubte man an einen Zusammenhang der Entstehung mit Glykogen. Dagegen sprach aber der ebenfalls hohe Heparingehalt der Lunge (CHARLES, SCOTT[13]). Die metachromatischen Granula (HOLMGREN, WILANDER[37]) der 1877 von P. EHRLICH[18] entdeckten Mastzellen, die in allen lockeren Bindegeweben, besonders auch in Subcutis, Submucosa und um dünnwandige Blutgefässe und Kapillaren vorkommen, bestehen aus Heparin, das zum Teil als Histamin-Hepa-

rinat vorliegt (WERLE-AMANN[112], GIBIAN[24]). Dasselbe gilt für die Leukozyten im Blut, deren Cytoplasma basophile metachromatische Granula enthält. Nach EHRLICH sind Mastzellen "indices of the nutritional state of the connective tissue". SYLVEN[101] und STAEMMLER[97] glauben, dass die Mastzellen die metachromatische oder freie chromotrope Substanz produzieren.

Struktur

Heparin ist ein polymerisiertes Disaccharid aus D-Glucuronsäure und D-Glucosamin, das mit 1 bis 3 Sulfatgruppen verestert ist, von denen eine an den N des Glucosamin gebunden ist. Ausserdem ist in 0 bis 2 OH-Gruppen der H durch SO_3H substituiert. Diese Formel (Abb. 3) für Rinderheparin ist jedoch noch hypothetisch. Ein weiteres Heparin, β-Heparin, ist wahrscheinlich identisch mit Chondroitinschwefel-

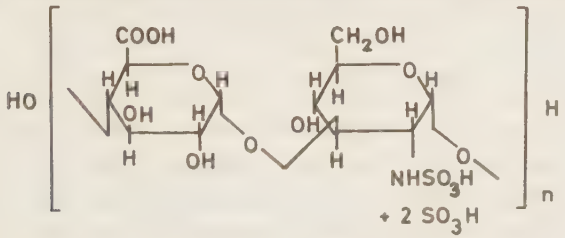

Abb. 3. D-Glucuronsäure D-Glucosamin-N-Sulfonsäure

säure B. Es setzt sich aus einer Uronsäure und N-Acetyl-D-Galactosamin zusammen (GIBIAN[24]). Das Molekulargewicht von Heparin beträgt 20 000 ($1,7 - 2,9 \cdot 10^4$). Die Summenformel lautet $(C_{24}H_{31}N_2S_5Na_7)_x$ (WOLFROM[115]). 1 Molekül enthält ungefähr 50 SO_3H- Gruppen. In den Histamin-Heparinatkomplexen kommen auf 1 Molekül Heparin 22 Moleküle Histamin; so werden fast alle Sulfogruppen von Heparin mit Histamin besetzt (WINTERSTEIN[113]).

Eigenschaften

a. physikalische:

Infolge der vielen Sulfatgruppen ist Heparin stark sauer. Wie alle Mucopolysaccharide ist es in Wasser leicht löslich. (SMITH u. Mitarb.[96]). Die optischen Drehwerte liegen bei + 40 - 70°. Bei der Elektrophorese wandert Heparin auf Grund seines kleinen Molekulargewichtes schneller als die andern Mucopolysaccharide.

b. chemische und biochemische:

Die saure Hydrolyse der Heparinketten ist wegen des hohen Sulfatgehaltes erschwert. Fermentativ kann Heparin nicht angegriffen werden; es ist sicher kein Substrat der Testeshyaluronidase und die Funktion der Heparinasen ist noch nicht sicher bekannt. Es wird auch von bakteriellen Enzymen nicht hydrolysiert (CLEAN, HALE[14]), ebensowenig von Trypsin (CHARLES, SCOTT[13]).

Heparin kann sich mit Proteinen bei einem spezifischen pH zu schwerlöslichen Komplexen verbinden, wie alle Mucopolysaccharide als Makroanionen. Es verschiebt dabei den Isoelektrischen Punkt des Proteins (LANGECKER[49]). Darauf beruht z.B. die hemmende oder aktivierende Wirkung auf Fermentsysteme. Das Ausmass der Reaktion steigt mit der Zahl der sauren Gruppen. Diese Wirkung kann auch in vivo durch basische Komponenten aufgehoben werden, wie z.B. durch Protaminsulfat. Der Inhibitoreffekt von Heparin auf Hyaluronidase scheint wegen der Substratähnlichkeit auf einer kompetitiven Hemmung zu beruhen.

Wegen seines kleinen Molekulargewichtes, das eine Akkumulation verhindert, hat Heparin die geringste Toxizität von allen Mucopolysacchariden.

Funktion

Die Heparinfunktion muss im Bindegewebe liegen (RILEY[85]). a. Heparin ist ein natürliches Antikoagulans im zirkulieren-

den Blut. Auf diese"hämische" Funktion zur Verhinderung von Thrombosen deutet das perivaskuläre Vorkommen hin. Heparin gelangt über den sogenannten Mastzellzyklus ins Blut (nicht direkt durch die Gefässwand hindurch, sondern vom Bindegewebe über die Lymphe ins Blut). Zur antikoagulantischen Aktivität trägt besonders die Schwefelgruppe bei (WOLFROM, SHEN, SUNNER[116]). Heparin hemmt zusammen mit einem Albuminkofaktor die Bildung von Thrombin und dessen Wirkung auf die Fibrinogenese, ebenso die Vorphase der Gerinnung durch die Blutplättchen.

b. Heparin hat Lipämieklärwirkung.
c. Es beeinflusst die Wundheilung (KLINGENBERG[44]), die von der Fähigkeit der Gewebe abhängt, sulfatierte Mucopolysaccharide zu synthetisieren. Saure Polysaccharide scheinen von Fibroblasten und Mastzellen im Granulationsgewebe abgesondert zu werden. Durch Fibroblasteninfiltration oder Einwanderung anderer Bindegewebszellen ist also die Produktion von sauren Mucopolysacchariden in verletzten Geweben erhöht (LAYTON[50]).

d. Heparin beeinflusst das Wachstum bzw. die Zellteilung in Gewebekulturen durch Fermentbeeinflussung (KLINGENBERG[44]), und zwar im Sinne einer Mitosehemmung.

e. Heparin kann bei sensibilisierten Tieren allergische Reaktionen unterbinden (GENTELE, HOLMGREN[21]).

f. Ein lokaler Mastzellzyklus spielt eine Rolle in der Ablagerung, Absorption und Wiederablagerung von Fibrillen im Bindegewebe. Mastzellen treten immer im jungen Gefässbindegewebe auf, in dem gleichzeitig eine Fibrillogenese vorliegt.

Reines Heparin, das in aqua dest. so wirksam ist wie in NaCl, kann mit löslichem Kollagenprotein in vitro reagieren: die entstandenen Fibrillen haben aber keine grosse Ähnlichkeit mit den natürlichen Fibrillen (MORRIONE[68]). Sie sind doppelbrechend und geben die typischen kollagenen Farbreak-

tionen, auch wenn sie im Elektronenmikroskop strukturlos erscheinen. Nach PORTER[79] induziert Heparin die Faserbildung. Die Mastzellen spielen also auf Grund ihrer Heparinproduktion eine Rolle in der Fibrogenese.

g. Heparin kann als biologischer Ionenaustauscher betrachtet werden, da es die Bindung und Lösung von Histaminmolekülen im Bindegewebe vermittelt (HIGGINBOTHAM, DOUGHERTY[34]). Von den übrigen sauren Mucopolysacchariden können folgende Gruppen als Ionentauscher wirken: PO_4, SO_4, NH, COOH und zwar wegen ihrer beweglichen Kationen als Kationentauscher. HIGGINBOTHAM[33] nennt das Zusammenspiel von Fibroblasten, Mastzellen und Grundsubstanz-Mucopolysacchariden Micellophagose. Diese ist nur dem Bindegewebe eigen; sie gilt als der natürliche Prozess, der den funktionellen Zustand des Bindegewebes aufrecht erhält.

b. Chondroitinschwefelsäure

Vorkommen

Man unterscheidet:
1. Chondroitin, das nur gesichert aus Rindercornea isoliert werden konnte,
2. Chondroitinsulfat A in Haut, Knorpel und Cornea,
3. Chondroitinsulfat B in Haut, Sehnen und ausgereiftem Bindegewebe,
4. Chondroitinsulfat C in Knorpel, Nabelschnur, Sehnen und ausgereiftem Bindegewebe.

Struktur

Chondroitin setzt sich aus D- Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Galactosamin zusammen. Die Chondroitinschwefelsäuren haben am Hexosaminrest noch Sulfatgruppen. Chondroitinsulfat C ist niedriger polymerisiert als A, sonst sind beide homolog. (Abb. 4). Chondroitinsulfat B setzt sich aus einer Uronsäure

(nicht oder z.T. D-Glucuronsäure, vor allem L-Iduronsäure), N-Acetyl-D-Galactosamin und Sulfat zusammen.

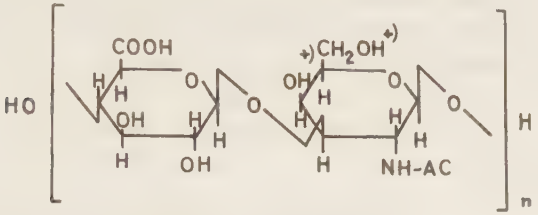

Abb. 4. D-Glucuronsäure N-Acetyl-D-Galactosamin

+) Die H^+ dieser Gruppen sind durch SO_3H substituierbar.

Chondroitinsulfat ist salzartig mit Proteinen verbunden. Chondroitinsulfat A hat ausserdem noch Nebenvalenzbindungen, z.B. mit Kollagen. Das Molekulargewicht der Chondroitinschwefelsäuren liegt bei 1 bis 14 · 10^4.

Eigenschaften

a. physikalische:

Chondroitinschwefelsäure ist in Wasser leicht löslich wie alle Mucopolysaccharide. Chondroitinsulfat A zeigt Strömungsdoppelbrechung. Elektrophoretisch wandert es schneller als z.B. Hyaluronsäure wegen seiner stärkeren negativen Ladungen.

b. chemische und biochemische:

Durch fermentative Hydrolyse können innenständige Hexosaminidbindungen mit Testeshyaluronidase gelöst werden. Die Chondroitinsulfate verhalten sich den einzelnen Hyaluronidasen gegenüber verschieden: einige werden abgebaut, andere hemmen deren Wirkung.

Chondroitinschwefelsäure stabilisiert die Sehnenstruktur, indem sie Quer- und Längsbindungen verstärkt. Diese Tatsache erklärt sich aus den Experimenten von JACKSON und BALL[40].

die gelöstes Kollagen mit Chondroitinschwefelsäure präzipitiert hatten. Diese Fasern waren in 0,9% NaCl unlöslich. Nach Hyaluronidasebehandlung, die eine Öffnung der durch Chondroitinschwefelsäure hergestellten Bindungen bewirkte, lösten sich die Fasern auf.

c. Hyaluronidase

Vorkommen

Hyaluronidasen kommen in fast allen Organen vor. Der Ort der Bildung ist jedoch unbekannt. Man kann nach dem Hauptvorkommen 4 Gruppen unterscheiden:

1. Testeshyaluronidase, die durch Hydrolyse auf Hexosaminidbindungen depolymerisierend wirkt. Sie kommt mengenmässig am meisten vor,
2. Bakterielle Hyaluronidase spaltet nur sulfatfreie Substrate und zwar auch die Hexosaminidbindungen, unter gleichzeitiger Wasserabspaltung,
3. Blutegelferment, das β-Glucuronidbindungen hydrolysiert,
4. sonstige hyaluronatabbauende Fermente.

CLEAN und HALE[14)] stellten folgende Vorkommen diffusions- und permeabilitätsfördernder Stoffe fest:

Keimepithel der Spermatozoen, Staphylokokkenfiltrate, bösartige Tumoren und tierische Gifte.

Struktur

Hyaluronidasen sind "Endopoly -β- hexosaminidasen".

Eigenschaften

Hyaluronidasen sind substratspezifisch. Sie depolymerisieren Hyaluronsäure auf jeden Fall, evtl. auch einige andere Mucopolysaccharide. Testeshyaluronidase spaltet Hyaluronsäure und Chondroitin mit gleicher, Chondroitinsulfat A und C mit verminderter Geschwindigkeit. Bakterielle Hyalu-

ronidase spaltet ebenfalls Hyaluronsäure und Chondroitin. Alle Hyaluronidasen sind leicht wasserlöslich. Der Isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,5. Durch proteinschädigende Einflüsse können Hyaluronidasen auch geschädigt werden. Sie haben ihr pH-Optimum bei pH 6,5. NaCl-Zusatz ist erforderlich, damit es im Substrat befindliche Inhibitoren ausschalten kann (ALBURN, WHITLEY[1]).

Wirkungsweise und Funktion

Die Hyaluronidasen verändern die Eigenschaften ihrer Substrate in Parallele zu deren abnehmender Teilchengrösse. Am biologischen Objekt haben sie folgende Wirkungen:

1. Spreading: d.i. eine 2 bis 3 dimensionale allgemeine Diffusion in den Geweben (DURAN-REYNALS[17]). Es kommt zu einer veränderten, leichteren Ausbreitungsfähigkeit von Stoffen, was z.B. bei Injektionen verschiedener Art Verwendung findet (Infusionen, schnellerer Wirkungseintritt von Lokalanaesthetika), oder zur Resorption von Ergüssen und Haematomen. Die eigentliche Spreadingwirkung kann nur innerhalb der ersten 5 Stunden gewertet werden (Spreading-Faktor = DURAN-REYNALS-Faktor).
2. Permeabilitäts-und Diffusionsänderung: d.i. eine 1-dimensionale Wanderung oder Permeation durch die Membran hindurch. Durch diese erhöhte Membranpermeabilität wird die perkutane Resorption gefördert, was z.B. bei der Aerosolierung von Wichtigkeit ist, zur besseren Resorption von Medikamenten in den Lungenbläschen. Die Permeabilität ist ein Wechselspiel zwischen Aufbau und Hydrolyse der Mucopolysaccharide (RÖSSING[88]).

Durch die Hydrolyse der Polysaccharide tritt gleichzeitig eine Änderung im Wasserbindungsvermögen ein. Dies bewirkt eine Viskositätsänderung, was sich wiederum in einer Verflüssigung der mit Hyaluronidase behandelten Medien bemerkbar macht (STEMMERMANN[98]; SCHMID, ROSA, NAIR[90]; ANDERMAUR, BRODHAGE[2]; MATHEWS, DORFMAN[57]). Dadurch wird auch die Bedeutung der Mucopolysaccharide in Grundsubstanz und

Interzellularsubstanz für den Wasserstoffwechsel und Ionenaustausch verständlich.

Fermentative Steuerung des Hyaluronsäure- Hyaluronidase- Systems

ACTH hemmt die Aktivität der Hyaluronidase und die Bildung von Hyaluronsäure. Ebenso machen noch einige andere Hormone ihren Einfluss in diesem Wechselspiel geltend. So kann eine hormonelle Dysfunktion auch eine Störung im Wechselspiel Ferment- Substrat bedingen. Bei den Kollagenkrankheiten liegt eine Störung in diesem System vor: es treten vermehrt Seruminhibitoren auf. Die Hyaluronidasehemmung wird durch Antirheumatika gesteigert und die Spreadingwirkung gehemmt. So kann sich z.B. die Hyaluronsäure in der Synovialflüssigkeit bei Gelenkrheumatismus ansammeln(RÖSSING[88]).

Bei Sklerödem, Keloiden und Myxödem ist vermehrt Hyaluronsäure nachweisbar, was wiederum zu einer Erhöhung der Viskosität führt. Es liegt eine pathologische Verschiebung des normalerweise festliegenden Polymerisations- Depolymerisationsverhältnisses der Glykoproteine vor. Alle diese 3 Krankheitsbilder reagieren auf Hyaluronidasezufuhr teils definitiv, teils befristet (KEINING, BRAUN-FALCO[43]).

Eigene Untersuchungen

Material und Methode

Sämtliche Untersuchungen wurden im kollagenen Gewebe der Haut durchgeführt. Wir verwandten hierzu Hautstückchen von Autopsien[+]. Obwohl nach den Untersuchungen von BETZ[10])

+) Dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen danken wir für die freundliche Überlassung der Präparate.

die Entnahmestelle der Haut für die Bestimmung der v.EBNER-schen Phenolreaktion nicht von Bedeutung ist, benutzten wir jeweils Haut vom Oberschenkel. Nach mindestens 24-stündiger Fixierung der Hautstückchen in 4% Formalin fertigten wir hiervon Gefrierschnitte von 5 µ Dicke an. Diese wurden in aqua dest. aufgefangen.

Zunächst bestimmten wir die positive Doppelbrechung der kollagenen Fasern an diesen Schnitten unter Wassereindeckung des Präparates. Dann wurde der Schnitt abgetrocknet, mit einem Tropfen einer 80% wässrigen Phenollösung eingedeckt und die nun auftretende negative Doppelbrechung gemessen. (In den folgenden Tabellen und Abbildungen als oH bezeichnet). Es folgten dann verschiedene Versuchsreihen an weiteren Schnitten derselben Hautstückchen:

1.) Von jeder Haut wurde ein Stück 4 Stunden in Hyaluronidase incubiert. Hiernach fertigten wir wie oben Gefrierschnitte an und massen den Wert der positiven Doppelbrechung bei Wassereindeckung, anschliessend den Wert der negativen nach der Phenolreaktion. (In den folgenden Tabellen und Abbildungen als mH bezeichnet).

2.) An den mit Hyaluronidase incubierten Schnitten machten wir folgende weitere Untersuchungen:

a. Nach Ablesen der positiven Doppelbrechung bedeckten wir einen Schnitt 15 Minuten mit Heparin, massen die positive Doppelbrechung in wässriger Heparinlösung, trockneten den Schnitt ab und machten daran die Phenolreaktion.(Als Hep bezeichnet).

b. Einen weiteren mit Heparin behandelten Schnitt legten wir 15 Minuten in Wasser, massen dann wieder die positive und nach Phenolzugabe die negative Doppelbrechung.(Als Hep wäss bezeichnet).

c. Einen anderen heparinbehandelten Schnitt incubierten wir 15 Minuten mit Protaminsulfat und gingen wie bei b. vor.(Als Hep Prot bezeichnet).

d. Einen mit Hyaluronidase behandelten Schnitt incubierten wir 15 Minuten mit Chondroitinsulfat, nachdem wir vorher an diesem den Wert der positiven Doppelbrechung bei Wassereindeckung gemessen hatten. In wässriger Chondroitinsulfatlösung lasen wir dann erneut den Wert

der positiven Doppelbrechung ab und machten anschliessend die Phenolreaktion. (Als ChSS bezeichnet).

e. einen wie unter d. behandelten Schnitt legten wir 15 Minuten in Wasser und stellten dann die Phenolreaktion an. (Als ChSS wässbezeichnet).

f. einen mit Hyaluronidase behandelten Schnitt incubierten wir 15 Minuten mit SP 54^{R} und gingen gleich wie unter a. und c. vor.

3.) Wir führten an Schnitten von unfixierten Hautstückchen die Phenolreaktion durch.

4.) Wir prüften die Phenolreaktion an Prokollagen, das sich mit dem Mikrotom sehr gut in 5 µ dicke Schnitte schneiden lässt. (Das verwendete Prokollagen stammte von Professor Dr. BUDDECKE am physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen).

5.) Wir färbten fixierte und unfixierte Schnitte, vor und nach Hyaluronidaseincubation, 20 Minuten mit 0,1 mol. Wässriger oder durch Puffer auf verschiedene pH-Werte (2; 4; 6,2) eingestellter Rivanollösung. Je ein gefärbter Schnitt wurde 20 Minuten gewässert. Alle Präparate deckten wir nach Entwässerung in Terpineol über Xylol in Caedax ein.

6.) Weiterhin färbten wir mit Hyaluronidase behandelte Schnitte vor und nach Heparinincubation und anschliessender 15-minütiger Wässerung 5 Minuten mit Toluidinblau. Nach 3-minütigem Wässern und Entwässerung in Terpineol deckten wir die Präparate in Caedax ein.

7.) Wir deckten von Hautschnitten, mit und ohne Hyaluronidasebehandlung, jeweils einen Schnitt in Caedax ein, nachdem wir ihn vorher in der aufsteigenden Alkoholreihe und Terpineol entwässert hatten.

Sämtliche Untersuchungen führten wir mit einem Polarisationsmikroskop "BIOPOL" der Firma LEITZ durch. Die Linsen unseres Mikroskopes sind frei von Spannungsdoppelbrechung. Wir verwendeten zu unseren Messungen jeweils ein Objektiv 25:1, A = 0,5. Die Gangunterschiede bestimmten wir mit dem BEREK-

Kompensator . Als Lichtquelle diente eine Niedervoltlampe. Zu den Messungen im monochromatischen Licht benutzten wir einen Monochromator der Firma LEITZ. Als Lichtquelle diente dabei eine Xenonlampe.

Reagenzien:

Hyaluronidase

Kinetin^{R} der Firma Schering AG Berlin.
1 Ampulle = 150 IE (mit einem ml aqua dest.aufgelöst) in 5 ml Phosphatpuffer bei pH 6,2 (nach GIBIAN[24]).

Heparin

Liquemin^{R} der Firma Hoffmann La-Roche.
1 ml ≙ 5000 IE.

Protaminsulfat

Protamin 1% der Firma Hoffmann La-Roche.
5 ml enthalten 50 mg Protaminsulfat in wässriger Lösung. Es verbindet sich mit Heparin zu unlöslichen Salzen. Zur Neutralisierung von 100 IE Heparin ist in vitro 1 mg Protaminsulfat notwendig.

Chondroitinsulfat

Chondroitinsulfat der Firma Fluka AG (Schweiz).
In 5% Lösung verwendet bei pH 7.

SP 54^{R} (Abb. 5)

ein Heparinoid der Firma bene-Chemie München-Solln.
SP 54^{R} ist ein Pentosanpoly-sulfoester mit einem Molekulargewicht von 2000.
1 ml ≙ 100 mg ,bei pH 6.

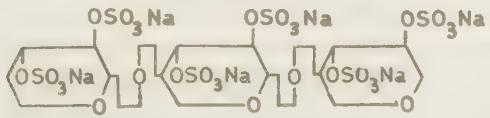

Abb. 5 : Formel für SP 54^{R}

Rivanol (Abb. 6)

2-aethoxy-6-9-diaminoakridinlactat.

Als Puffer verwendeten wir Zitronensäure-Phosphatpuffer (pH 4), Acetatpuffer (pH 2), Phosphatpuffer (pH 6,2)

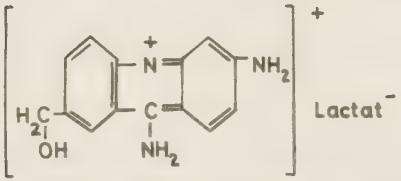

Abb. 6. Formel für Rivanol.

Die EBNERsche Phenolreaktion erfassten wir quantitativ mit Hilfe des Faktors $\frac{a+b}{a}$. 1958 beschrieb MISSMAHL[64) 66)] -analog zu den Reaktionen an der kollagenen Faser - dass an retikulären Fasern die positive Doppelbrechung durch Glyzerineindeckung in eine negative umgewandelt wird. Zur quantitativen Erfassung dieser topochemischen Reaktion führte er den Faktor $\frac{a+b}{a}$ ein. Durch Untersuchungen in neuerer Zeit konnte er zusammen mit BETZ[10)] zeigen, dass dieser Faktor auch bei der Phenolreaktion angewandt werden kann. Innerhalb dieses Faktors bedeutet a den Gangunterschied der positiven Doppelbrechung in mμ vor und b den Gangunterschied in mμ nach der Phenolreaktion. Eine Zunahme der negativen Doppelbrechung bedeutet also eine Erhöhung des Faktors.

In jedem Fall massen wir 10 Fasern an einem Schnitt, (in einigen Fällen auch an 3 Schnitten jeder Haut je 10 Fasern), vor und nach Phenoleindeckung und errechneten den Faktor $\frac{a+b}{a}$ für jede Einzelmessung. Wir untersuchten die Fasern, die nahe an der Grenze zum Epithel lagen. Als bezeichnenden Faktor der Häute bei den einzelnen Reaktionen gaben wir den Mittelwert dieser Einzelfaktoren an.

Beitrag zur Polarisationsoptik

Zur Polarisationsoptik möchten wir hier nur auf die wichtigsten Begriffe näher eingehen. Weitere Darstellungen

auf diesem Gebiet geben MISSMAHL[64) 65) 66)] und SCHMIDT[91)].

Man kann isotrope und anisotrope Körper unterscheiden. Die isotropen verhalten sich gegenüber Licht für alle Richtungen gleich, sowohl was die Fortpflanzungsgeschwindigkeit c als auch was die Lichtbrechung n betrifft. Bei anisotropen Körpern werden die Schwingungsformen vom Feinbau des Körpers vorgeschrieben. c und n sind richtungsabhängig. Das eintretende Licht wird in zwei senkrecht zueinander polarisierte Teile zerlegt. In beiden Schwingungsrichtungen herrschen verschiedene Brechzahlen und evtl. auch Absorptionszahlen. Die Verschiedenheit der beiden Brechzahlen erzeugt Doppelbrechung, die Verschiedenheit der beiden Absorptionskoeffizienten Dichroismus.Die Differenz der beiden Brechzahlen gibt die Stärke der Doppelbrechung an, entsprechend die Differenz der beiden Absorptionszahlen die Stärke des Dichroismus.Die Stärke der Doppelbrechung wechselt nach der Richtung des Lichtdurchganges.

Die Indikatrix, ein Rotationsellipsoid, gilt als Symbol der Doppelbrechung. Aus ihr kann man das optische Verhalten für jede Einfallsrichtung ablesen, indem man einen Schnitt senkrecht zum gewählten Lichteinfall durch das Zentrum legt. Man erhält so die wirksame Indexellipse, deren Achsen den Schwingungsrichtungen der linear polarisierten Anteile entspricht. Die Achsenlänge gibt die Brechzahl an, deren Differenz die Stärke der Doppelbrechung.

Positiv einachsige Doppelbrechung wird durch ein Ellipsoid symbolisiert, dessen längere Achse Rotationsachse ist. Hier wirkt auf das parallel der optischen Achse schwingende Licht der kleinste Brechungsindex. Einachsig heisst diese Doppelbrechung deshalb, weil im Rotationsellipsoid nur eine optische Achse vorkommt. Fällt Licht parallel zu derselben ein, so tritt keine Doppelbrechung auf. Die Stärke der Doppelbrechung ist immer dann am grössten, wenn das Licht senkrecht zur optischen Achse einfällt. Sie nimmt mit zunehmender Neigung gegen die optische Achse ab.

Die senkrecht zur optischen Achse stehende Achse der Indexellipse hat immer dieselbe Länge. Der dieser Achse zu-

gehörige Lichtanteil hat daher für jede Einfallsrichtung die konstante = ordentliche Brechzahl n_o.

Optische Anisotropie ist stets Ausdruck struktureller Anisotropie. Bei der Kollagenfaser liegt ein gestrecktes Rotationsellipsoid vor, dessen Rotationsachse parallel der Faserlänge verläuft.

Die Brechzahl wechselt mit der Farbe des Lichtes (Dispersion der Lichtbrechung). Daher hat die Indikatrix für verschiedene Farben verschiedene Form. Allgemein gilt: Die Änderung der Doppelbrechung in Abhängigkeit von der Farbe des Lichtes wird als Dispersion der Doppelbrechung bezeichnet.

Das Vorzeichen der Doppelbrechung kann man sich mit der Indikatrix erklären:

bei gestrecktem Ellipsoid: positiv

bei abgeplattetem Ellipsoid: negativ.

Die Unterscheidung, welche der beiden Schwingungsrichtungen der grossen bzw. der kleinen Achse entspricht, macht man mit dem BRACE-KÖHLER- oder dem BEREK-Kompensator.

Das Objekt liegt in Diagonallage zu den beiden Schwingungsrichtungen der Polars. So wird das vom Polarisator kommende Licht zu gleichen Teilen auf beide Schwingungsrichtungen des Objekts aufgeteilt. Zu diesen beiden Lichtanteilen gehören unterschiedliche Brechzahlen des Objekts; deshalb pflanzen sich beide Lichtanteile mit verschiedener Geschwindigkeit fort. Daraus folgt: wenn der eine gerade die Objektoberfläche erreicht hat, ist der andere schon um eine bestimmte Strecke in Luft voraus. Diese Strecke ist der Gangunterschied, also die Phasendifferenz. Er wird in Wellenlängen oder in mμ angegeben. In Luft nehmen beide Anteile wieder dieselbe Geschwindigkeit an und werden vom Analysator auf die gleiche Schwingungsrichtung und damit zur Interferrenz gebracht.

Ein Anstieg des Gangunterschiedes bedeutet ein Wachsen der Helligkeit. Bei einem Gangunterschied = 0 geht das vom Polarisator kommende Licht unverändert durch das Objekt hindurch und wird am gekreuzten Analysator ausgelöscht.

Ein ansteigender Gangunterschied bedeutet, dass sich die beiden Lichtanteile des Objekts zu einer elliptischen Schwingung zusammensetzen, deren grosse Achse parallel zur Schwingungsrichtung des Polarisators steht. Von dieser Schwingung lässt der Analysator eine Komponente durch, deren Grösse durch die Achse der Schwingungsellipse gegeben ist.

Steigt der Gangunterschied, so wird die Schwingungsellipse gedrungener, d.h. die dem Analysator parallele Komponente wird grösser.

Der BEREK-Kompensator besteht aus einer parallel zur optischen Achse geschnittenen Kalkspatplatte. Er ist um eine horizontale, diagonal zu den Schwingungsrichtungen von Polarisator und Analysator verlaufende Achse drehbar. Steht die Platte senkrecht zur Tubusachse, so ist in der Sehfeldmitte der Gangunterschied = O. Er wächst mit zunehmender Neigung und kann mit der Kompensatorformel aus dem Neigungswinkel ermittelt werden.

Ein Kompensator hebt die Wirkung des in Diagonallage zwischen gekreuzten Polars liegenden Objekts auf. Dieses verhält sich dann so, als ob der Gangunterschied = O wäre, ist also dunkel.

Ergebnisse

Insgesamt wurden bei unseren Versuchen in der oben angegebenen Weise Hautstückchen von 31 Erwachsenen und 10 Säuglingen untersucht.

1.) Das Verhalten der Phenolreaktion unter dem Einfluss von Hyaluronidase, Heparin und Chondroitinsulfat.

Der Faktor $\frac{a+b}{a}$ gibt uns ein Mass für die Stärke der Phenolreaktion. Wir haben daher in Tabelle I und II die Mittelwerte dieses Faktors aus den einzelnen Reaktionen getrennt für Erwachsene und Säuglinge angegeben. In den Abbil-

dungen 7 - 14 sind die Mittelwerte des Faktors $\frac{a+b}{a}$ für die einzelnen Untersuchungsreihen mit den entsprechenden 3σ - Grenzen eingezeichnet. Tabellarisch sind diese Werte in Tabelle V dargestellt.

Zur Sicherung, inwieweit die einzelnen Untersuchungsreihen statistisch gesichert gegeneinander abgegrenzt werden können, berechneten wir die entsprechenden T-Differenzen. Sie sind in Tabelle VI eingetragen.

Da sich bei den von uns untersuchten Hautstückchen von Patienten, welche an einem malignen Tumor verstorben sind, auffallende Werte ergaben, haben wir diese in Tabelle III gesondert dargestellt.

2 Fälle von Patienten mit Urämie zeigten ebenfalls atypische Werte; wir erhielten folgende Ergebnisse:

Geschlecht	Alter	oH	mH	Hep	Hep wäss	Hep Prot	ChSS	ChSS wäss
w	52	1,22	1,26	1,21	1,33	1,31	1,16	1,28
m	62	1,43	1,38	1,13	1,27	1,18	1,08	1,20

Bei 1 Fall eines Patienten mit altem Herzinfarkt und Herzversagen fanden wir folgende Werte:

Geschlecht	Alter	oH	mH	Hep	Hep wäss	Hep Prot	ChSS	ChSS wäss
w	82	1,53	1,35	1,39	1,43	1,59	1,38	1,69

2.) Der Einfluss von SP 54^R auf die Phenolreaktion

An den von uns mit SP 54^R untersuchten Häuten erhielten wir folgende Werte:

Erwachsene Nr.	SP 54^R	SP 54^R + Prot
3.	1,32	-
14.	1,24	1,35
19.	1,16	-

Säuglinge Nr.	SP 54^R	SP 54^R + Prot
1.	1,24	-
4.	1,36	1,40

3.) Die Phenolreaktion an Prokollagen

Bei Prokollagen mussten wir den Gangunterschied mit dem BRACE-KÖHLER-Kompensator messen, da die Werte sehr klein bzw. die Doppelbrechung sehr schwach war. Wir erhielten folgende Werte:

oH : 1,51
Hep : 1,40

4.) Besonderheit bei der Phenolreaktion

In wenigen Fällen konnte bei mit Hyaluronidase behandelten Schnitten auch nach Phenolzugabe noch an vereinzelten Fäserchen positive Doppelbrechung gefunden werden, besonders im subcutanen Gewebe.

Bei einigen Hautstückchen von Patienten mit Neoplasmen oder Urämie wurde die negative Doppelbrechung bei nicht mit Hyaluronidase behandelten Schnitten auf Phenolzugabe sehr schwach, viele Fasern verschwanden völlig wie bei Schnitten unfixierter Hautstückchen.(s. 5.)

5.) Die Phenolreaktion an Schnitten unfixierter Häute

Bei den Schnitten an unfixierten Häuten konnten wir jeweils nur die positive Doppelbrechung messen, da sich die Fasern nach Phenolzugabe völlig auflösten und daher keine Doppelbrechung mehr zu sehen war.

6.) Färbung des kollagenen Gewebes mit Rivanol

Wir konnten bei unseren Untersuchungen mit Rivanol nur dann das Auftreten negativer Doppelbrechung in Bezug zur Länge der Faser beobachten, wenn wir wässrige Rivanollösung benutzten. Mit gepufferten Farblösungen trat nie ein Wechsel des optischen Vorzeichens der Doppelbrechung an den von uns untersuchten fixierten und unfixierten kollagenen Fasern auf.Vorausgehende Behandlung mit Hyaluronidase

Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	oH	mH	Hep	Hep wäss	Hep Prot	ChSS	ChSS wäss
1	m	45	Kreislaufversagen	1,48	1,36	1,34	1,37	1,38	1,36	1,36
2	w	52	Kreislaufversagen	1,57	1,44	1,33	1,29	1,58	1,34	1,36
3	m	55	Pneumonie	1,45	1,37	1,35	1,41	1,40	1,31	1,39
4	m	84	Bronchopneumonie	1,52	1,32	1,26	1,39	1,35	1,23	1,33
5	w	67	Lungenembolie	1,39	1,34	1,28	1,52	1,62	1,33	1,45
6	m	31	Hirntumor	1,47	1,42	1,38	1,41	1,49	1,32	1,44
7	m	59	Pneumonie	1,58	1,41	1,34	1,46	1,50	1,39	1,43
8	w	58	Leberzirrhose	1,52	1,31	1,24	1,54	1,38	1,30	1,42
9	w	78	Lungenembolie	1,45	1,29	1,28	1,38	1,38	1,24	1,35
10	m	66	Hirntumor	1,40	1,24	1,21	1,41	1,40	1,20	1,28
11	m	34	Bronchiektasen	1,45	1,30	1,24	1,31	1,36	1,24	1,35
12	w	56	Hirntumor	1,42	1,28	1,26	1,40	1,37	1,23	1,33

Tab. I: Werte des Faktors $\frac{a+b}{a}$ der verschiedenen Untersuchungsreihen am Hautkollagen von Erwachsenen.

Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	oH	mH	Hep	Hep wäss	Hep Prot	ChSS	ChSS wäss
13	m	73	Unfall	1,50	1,27	1,26	1,35	1,38	1,28	1,44
14	w	62	Cor pulmonale	1,42	1,36	1,26	1,39	1,43	1,18	1,41
15	m	24	Pneumonie	1,48	1,34	1,23	1,35	1,43	1,21	1,37
16	w	62	Akute Cholezystitis	1,53	1,42	1,26	1,46	1,42	1,22	1,40
17	m	63	Unfall	1,45	1,36	1,24	1,33	1,48	1,21	1,37
18	w	76	Lungenödem	1,46	1,32	1,24	1,42	1,33	1,22	1,29
19	m	57	Encephalitis	1,53	1,29	1,22	1,29	1,30	1,25	1,27

Fortsetzung zu Tab. I.

Erläuterungen zu den Abkürzungen in den Tabellen und Abbildungen:

oH : Nach Fixierung in 4% Formalin

mH : Nach Fixierung in 4% Formalin und Hyaluronidaseincubation

Hep : Nach Fixierung in 4% Formalin, Hyaluronidaseincubation und Heparinbehandlung

Hep wäss : Nach Fixierung in 4% Formalin, Hyaluronidasebehandlung, Heparinbehandlung und Entwässerung

Hep Prot : Nach Fixierung in 4% Formalin, Hyaluronidase-, Heparin-u. Protaminsulfatbehandlung

ChSS : Nach Fixierung in 4% Formalin, Hyaluronidase- und Chondroitinsulfatbehandlung

ChSS wäss: Nach Fixierung in 4% Formalin, Hyaluronidase- und Chondroitinsulfatbehandlung und Entwässerung

Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	oH	mH	Hep	Hep wäss	Hep Prot	ChSS	ChSS wäss
1	w	1 Tag	Asphyxie	1,68	1,46	1,25	1,42	1,64	1,42	1,49
2	w	2 Stund.	cong. Zwerchfell-hernie	1,62	1,48	1,31	1,46	1,62	1,31	1,53
3	m	17 Tage	Encephylitis	1,45	1,37	1,36	1,42	1,51	1,34	1,41
4	m	2 Tage	Frühgeburt	1,55	1,31	1,31	1,44	1,29	1,25	1,29
5	w	2 Tage	Erythroblastose	1,54	1,42	1,27	1,43	1,35	1,31	1,37
6	m	4 Tage	Frühgeburt	1,53	1,36	1,30	1,43	1,37b	1,31	1,37
7	m	10 Woch.	Bronchopneumonie	1,49	1,28	1,27	1,36	1,40	1,22	1,35
8	m	9 Tage	Frühgeburt	1,50	1,29	1,24	1,34	1,44	1,27	1,37
9	m	1 Tag	Frühgeburt	1,50	1,29	1,25	1,40	1,31	1,24	1,31
10	m	2 Monate	Viruspneumonie	1,49	1,42	1,26	1,46	1,38	1,23	1,31

Tab. II: Werte des Faktors $\frac{a+b}{a}$ der verschiedenen Untersuchungsreihen am Hautkollagen von Säuglingen.

Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	oH	mH	Hep	Hep wäss	Hep Prot	ChSS	ChSS wäss
1	m	62	Lungentumor	1,42	1,32	1,32	1,43	1,46	1,29	1,28
2	m	56	Bronchuscarcinom	1,43	1,54	1,24	1,40	1,77	1,25	1,29
3	m	50	Hypernephrot.Carcinom der Lunge	1,16	1,40	1,30	1,48	1,48	1,28	1,29
4	w	42	Ovarialcarcinom	1,42	1,34	1,33	1,43	1,38	1,15	1,41
5	w	65	Adenocarcinoma uteri	1,16	1,32	1,29	1,43	1,32	1,25	1,33
6	w	60	Ovarialcarcinom	1,44	1,33	1,20	1,42	1,34	1,19	1,33
7	m	58	Cardiacarcinom	1,51	1,46	1,42	1,56	1,46	1,37	1,45
8	w	64	Rundzellensarkom	1,52	1,10	1,06	1,09	1,11	1,05	1,12
9	m	66	Bronchuscarçinom	1,54	1,37	1,34	1,34	1,39	1,30	1,38

Tab. III: Werte des Faktors $\frac{a+b}{a}$ der verschiedenen Untersuchungsreihen am Hautkollagen von Patienten mit Neoplasmen.

	Faktor $\frac{a+b}{a} \pm 3\sigma$	Streubreite
oH	1,48 ± 0,177	1,657 - 1,303
mH	1,34 ± 0,201	1,541 - 1,139
Hep	1,27 ± 0,174	1,444 - 1,096
Hep wäss	1,39 ± 0,225	1,615 - 1,165
Hep Prot	1,42 ± 0,246	1,666 - 1,174
ChSS	1,27 ± 0,195	1,465 - 1,075
ChSS wäss	1,37 ± 0,186	1,556 - 1,184

Tab.IV : Mittelwerte des Faktors $\frac{a+b}{a}$ der einzelnen Versuchsreihen (19 Erwachsene).

	Faktor $\frac{a+b}{a} \pm 3\sigma$	Streubreite
oH	1,54 ± 0,204	1,744 - 1,336
mH	1,37 ± 0,222	1,592 - 1,148
Hep	1,28 ± 0,081	1,361 - 1,199
Hep wäss	1,42 ± 0,117	1,537 - 1,303
Hep Prot	1,43 ± 0,366	1,796 - 1,064
ChSS	1,29 ± 0,183	1,473 - 1,107
ChSS wäss	1,38 ± 0,233	1,631 - 1,147

Tab. V : Mittelwerte des Faktors $\frac{a+b}{a}$ der einzelnen Versuchsreihen (10 Säuglinge).

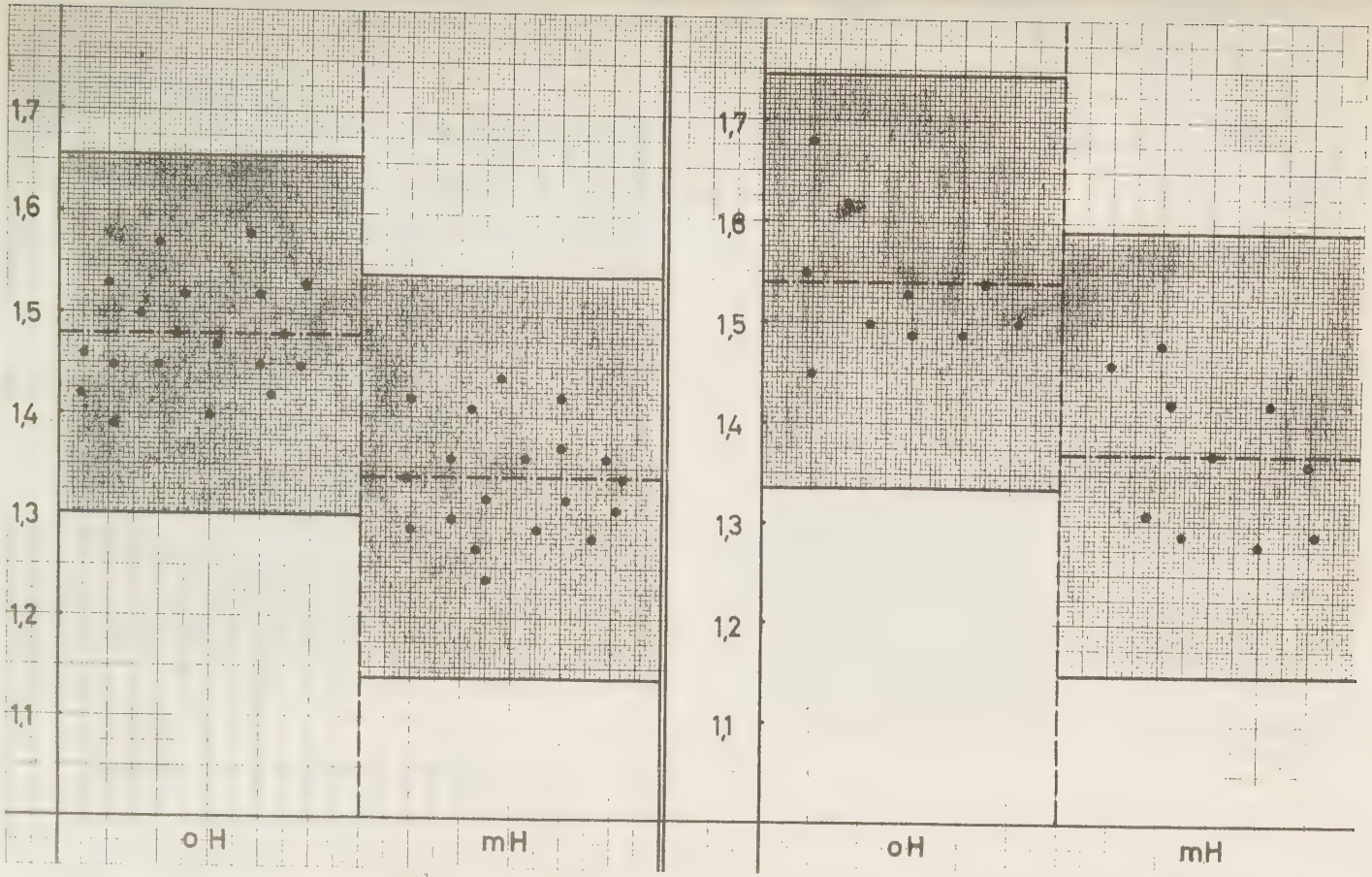

Abb.7: Absinken des Faktors $\frac{a+b}{a}$ nach Hyaluronidaseincubation bei Erwachsenen.
▨ 3σ - Bereich.

Abb.8: Absinken des Faktors $\frac{a+b}{a}$ nach Hyaluronidaseincubation bei Säuglingen.
▨ 3σ - Bereich.

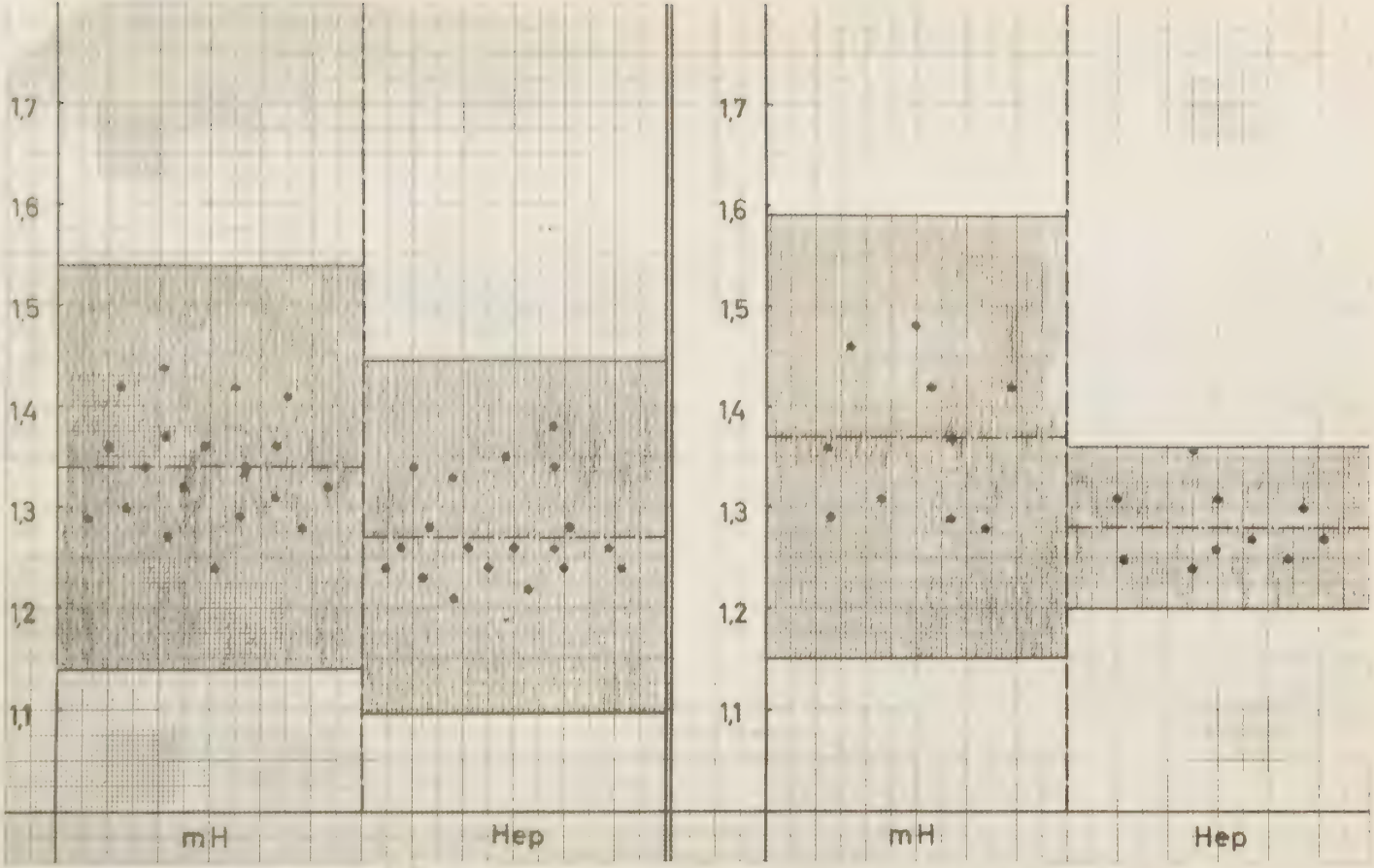

Abb.9: Absinken des Faktors $\frac{a+b}{a}$ nach Heparinincubation bei Erwachsenen.
▬ 3σ - Bereich.

Abb.10: Absinken des Faktors $\frac{a+b}{a}$ nach Heparinincubation bei Säuglingen.
▬ 3σ - Bereich.

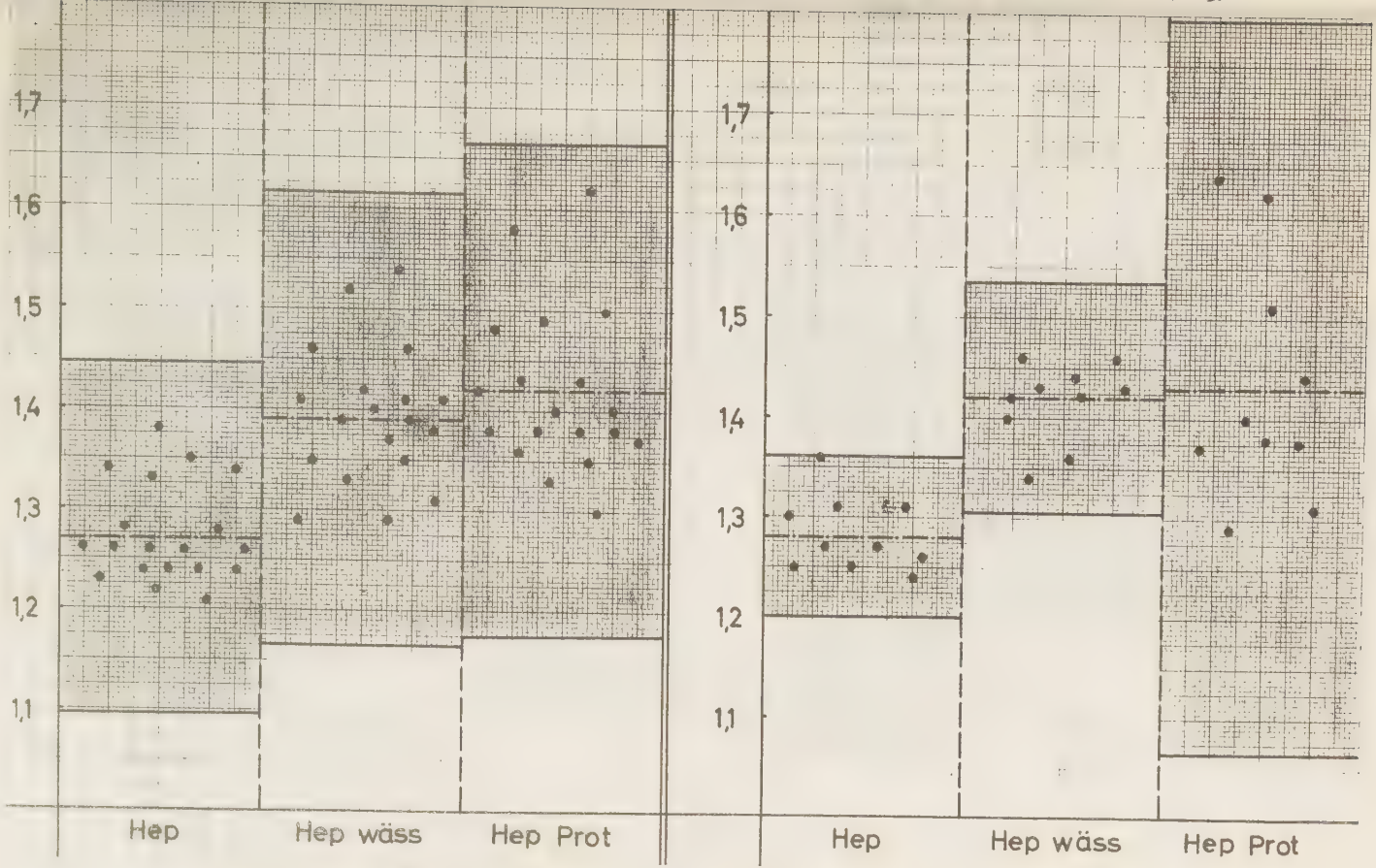

Abb.11: Anstieg des Faktors $\frac{a+b}{a}$ nach Entwässerung und Protaminsulfatincubation heparinbehandelter Schnitte bei Erwachsenen.
▨ 3 σ - Bereich.

Abb.12: Anstieg des Faktors $\frac{a+b}{a}$ nach Entwässerung und Protaminsulfatincubation heparinbehandelter Schnitte bei Säuglingen.
▨ 3 σ - Bereich.

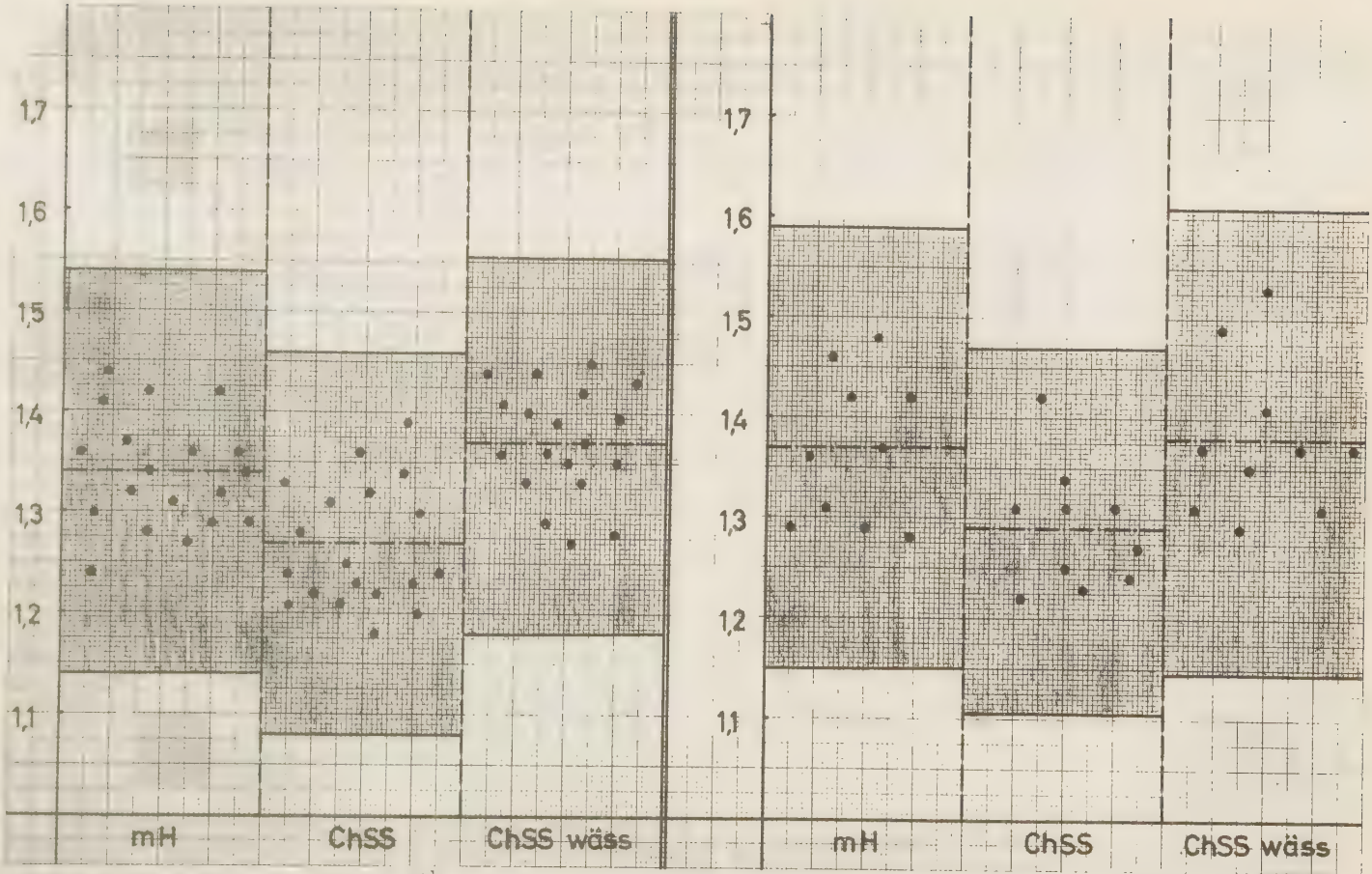

Abb.13: Absinken des Faktors $\frac{a+b}{a}$ nach Chondroitinsulfatindubation und Anstieg nach Entwässerung bei Erwachsenen.
▒ 3σ - Bereich.

Abb.14: Absinken des Faktors $\frac{a+b}{a}$ nach Chondroitinsulfatincubation und Anstieg nach Entwässerung bei Säuglingen.
▒ 3σ - Bereich.

Säuglinge / Erwachsene	oH	mH	Hep	Hep wäss	Hep Prot	ChSS	ChSS wäss
oH	3,68	4,9	10,5	5,0	2,33	4,72	4,73
mH	6,95	1,87	3,3	1,85	1,35	2,6	0,35
Hep	10,68	3,34	0,6	8,37	37,2	0,45	3,57
Hep wäss	3,81	2,5	5,4	0,88	0,36	5,72	1,28
Hep Prot	2,59	3,4	6,6	1,03	0,28	3,2	1,11
ChSS	11,1	3,22	0,2	5,77	4,67	1,0	2,9
ChSS wäss	5,6	1,68	3,69	1,04	2,08	5,4	0,38

Tab. VI:

T-Differenzen der einzelnen Versuchsreihen: T-Werte für Erwachsene
T-Werte für Säuglinge
T-Werte Erwachsene gegen Säuglinge

Geforderte Mindestwerte:

Erwachsene: 36 Freiheitsgrade: T = 3,22

Säuglinge : 18 Freiheitsgrade: T = 3,48

Vergleich Erwachsene gegen Säuglinge: 27 Freiheitsgrade: T = 3,3

beeinflusst das optische Verhalten der Faser bei der Rivanol-Färbung nicht.

7.) Verhalten der kollagenen Faser nach Anfärben mit Toluidinblau

An unseren Schnitten von Hautstückchen, welche mit Hyaluronidase behandelt wurden, lässt sich lediglich an ganz vereinzelten, direkt unter dem Epithel liegenden Fasern eine geringfügige Metachromasie feststellen. Die übrigen kollagenen Fasern haben keinen Farbstoff angenommen. Ausserdem erkennt man eine Blaufärbung der Epithelschicht und der Haarbälge.

In den Schnitten des Prokollagens sind die Fasern eben sichtbar bläulich angefärbt.

Ein völlig anderes Bild erhalten wir jedoch nach Incubation unserer Schnitte mit Heparin. Hier färben sich nun sämtliche Fasern intensiv metachromatisch an. Zwischen gekreuzten Polars geben sie eine blaue anomale Polarisationsfarbe, die bei Kompensation mit dem BRACE-KÖHLER-Kompensator im positiven Drehsinn intensiver wird und bei Kompensation im negativen Drehsinn in rot übergeht. Über dem Polarisator allein lässt sich an diesen Präparaten Dichroismus hellblau-blau nachweisen. Dabei erscheinen sie hellblau, sofern die Schwingungsrichtung des Lichtes parallel zur Faser ist. Im monochromatischen Licht ist der Dichroismus im grün-gelben Licht am deutlichsten. Die Fasern erscheinen bei allen geprüften Wellenlängen (460 - 640 mμ) dunkler, sofern das linear polarisierte Licht senkrecht zur Faserlänge schwingt.

Die von uns untersuchten Prokollagenfasern zeigen grundsätzlich dasselbe Verhalten, jedoch in deutlich schwächerem Masse.

Diskussion der Ergebnisse

Die Frage nach den Zusammenhängen zwischen Bindegewebsfasern und Grundsubstanz ist schon vielfach diskutiert

und in verschiedener Weise beantwortet worden. Sind die Fasern einfach in die Grundsubatanz eingebettet, werden sie von dieser umspült oder besteht ein festes Gefüge zwischen beiden Partnern?

Auf Beziehungen zwischen beiden lässt sich aus der Entwicklung der Fasern schliessen (WASSERMANN[110]). Der noduläre Bau der Mikrofibrillen, deren Durchmesser 150 - 200 Å beträgt, deutet wahrscheinlich auf die spätere Periodizität hin. Diese Primärfibrillen liegen z.T. innerhalb des Cytoplasmas der Fibroblasten. Diese treten nur in Aktion bei Anwesenheit von Vitamin C (WOLBACH[114]). Die ersten makromolekularen Stufen der Fibrillen haben einen Durchmesser von 40 - 80 Å, sie liegen in der Aussenzone des Cytoplasmas. Das weitere Wachstum erfolgt in der Grundsubstanz. Der Fibroblast scheidet dann gleichzeitig Grundsubstanz und Prokollagen ab. Zusammen mit den Primärfibrillen wird das ganze Material der fibrillogenen Zone ausgeschieden. Aus dem Zusammenspiel von Faser- und Grundsubstanzbildung geht hervor, dass bei der Faserbildung ein Teil der Grundsubstanz als Kittsubstanz eingebaut wird. Dieses mukoide Material macht die Faser zäh und widerstandsfähig.

MEYER u.Mitarb.[61] stellten fest, dass Grundsubstanz und Bindegewebe doch fester gebunden sind als bisher angenommen wurde. Dagegen steht die Ansicht von GERSH[22], nach der die Fibrillen - besonders die des lockeren Bindegewebes - einfach in das homogene Material der Kittsubstanz eingetaucht sind.

ROBB-SMITH[87] definiert Bindegewebe als kontinuierliche Matrix, die zwischen der Durchsichtigkeit der Warthonschen Sulze und der Härte der Knochen variiert. In diese Matrix aus Mucopolysacchariden sind kollagene, elastische und retikuläre Fasern eingebettet; diese betrachtet er als ausgefällte Skleroproteine.

RANDALL[82] hält die Polysaccharide ebenfalls für Kittfaktoren in den Fasern.

Nach LINDNER[56] kommen die aus Mucopolysacchariden und Eiweisskörpern bestehenden Kittsubstanzen an der Faserober-

fläche, interfibrillär und interfilamentär vor.

NEMETH-CSOKA[71] stellte auf Grund seiner polarisationsoptischen Untersuchungen fest, dass das submikroskopische Strukturgefüge kollagener Fasern aus 2 submikroskopisch orientierten Komponenten bestehe:

Die mukoide Komponente wies er mit der anisotropen Rivanolfärbung nach, die Eiweisskomponente mit der Phenolreaktion. Das relative Verhältnis beider sei an der Doppelbrechung festzustellen. Die submikroskopische Ordnung ist jedoch noch nicht geklärt.

DELAUNEY und BAZIN[16] nehmen an, dass zwischen Kollagen und den Mucopolysacchariden eine wirkliche chemische Verbindung existiert. Beide Substanzen haben eine grosse gegenseitige Affinität.

SCHWARZ[94] und DAY[15] sind der Ansicht, dass die Kittsubstanz die Fasern bis zu den Mikrofibrillen durchdringt. Wahrscheinlich sind die Polysaccharide ein Teil des strukturellen Gerüstwerks der Faser (GRASSMANN[26]).

Nach RANKE[83] sind die Fibrillen nur mit Kittsubstanz imprägniert.

Zwischen den Fibrillen sind nicht nur Mucopolysaccharide, sondern auch lösliches Kollagen und Kollagenvorstufen, die Tropokollagen genannt werden und den Faserkittsubstanzen entsprechen. Es ist noch ungewiss, ob dieses lösliche Kollagen von Fasern, Fibrillen oder von der Grundsubstanz stammt. Das Erscheinen unterschiedlicher Fibrillen nach Extraktion der Substanzen unterstützt die Annahme, dass es zwischen den Fibrillen liegt (TELKKÄ und KULONEN[102]). Durch Quellung wird eine um die Fibrille gelegene Hülle aus einem Mucopolysaccharid - Protein - Gel aufgelöst. In dieser gelösten Substanz konnten LINDNER u. Mitarb.[56] Zuckerbestandteile und ninhydrin-positive Substanzen (Gly, Pro, Oxy-Pro, Ser, Thre) nachweisen, was eine Bestätigung dafür ist, dass Tropokollagen zwischen den Fibrillen vorkommt.

MATHEWS u. Mitarb.[58] geben für den Chondroitinsulfat-A-Komplex ein Modell an, in dem am linearen Eiweisskern die Mucopolysaccharidketten relativ beweglich aufgehängt sind.

Nach WASSERMANN[108] geht die Kittsubstanz kontinuierlich in die Grundsubstanz über. Bei verschiedenen Fasertypen hat die Kittsubstanz eine verschiedene Konsistenz. Beim Schrumpfen und Quellen der Grundsubstanz werden die interfibrillären Räume grösser und kleiner.

Ausser sauren Mucopolysacchariden kommen auch neutrale im Bindegewebe vor. Sie scheinen kovalent an Peptid oder Protein gebunden zu sein. Bis jetzt sind sie jedoch noch nicht isoliert und chemisch charakterisiert(MEYER, DAVIDSON, LINKER, HOFFMANN[61]).

KÜNTZEL[47] beschreibt 1941, dass sich randständige reaktive Gruppen der Polypeptidketten mit Kittsubstanz quer verbinden können.

1942 vermuteten MEYER und COHEN[60] , dass saure Mucopolysaccharide in ihrer Eigenschaft als multivalente Anionen die Proteinmoleküle zusammenkitten, um fibröse Makromoleküle und Mikrofibrillen zu bilden.

Neben diesen Erwägungen sprechen auch jene Untersuchungen für Beziehungen zwischen der kollagenen Faser und der Grundsubstanz, in denen gezeigt werden konnte, dass durch Mucopolysaccharide aus Kollagen-Lösungen Fasern ausgefällt werden können. So beschrieben verschiedene Autoren eine Präzipitation von Fasern durch Zugabe von Mucopolysacchariden oder sauren und basischen Salzen zu Kollagen-Lösungen.

Nach FREY-WYSSLING[20] tritt bei der Ausfällung von kollagenen Fibrillen aus löslichem Kollagen eine lineare Aggregation der Teilchen ein (Abb. 15).Diese stellt er sich als Dipole vor, die 70 - 80 Å dick sind und sich durch seitliche Aggregation zu Mikrofibrillen zusammenlagern.Sie weisen eine Breite von 200 - 2000 Å auf.

Abb. 15

HIGHBERGER, SMITH und GROSS[36] konnten bei der Ausfällung von essigsauren und zitronensauren Kollagen-Lösungen mit Chondroitinschwefelsäure bzw. Heparin 3 Typen von Kollagenfasern unterscheiden. Sie zeigen elektronenoptisch:

1. Perioden mit 650 Å,

2. Perioden mit 2000 - 3000 Å als long-spacing-Fasern,
3. keine periodische Struktur.
Die long-spacing-Fasern wurden bis jetzt in der Natur noch nicht angetroffen. Man kann sie auch durch Zusatz kohlehydrathaltiger Stoffe zu Prokollagen-Lösungen erhalten.

MORRIONE[68] zeigte, dass Fasern, die mit reinem Heparin aus löslichem Kollagenprotein gefällt wurden, mit den natürlichen keine allzugrosse Ähnlichkeit aufweisen. Bei RANDALL[81] dagegen haben die präzipitierten Fasern die gleichen substantiellen Strukturen wie die nativen Fasern.

NEMETH-CSOKA[71] und NAGEOTTE[69] zeigten, dass die mit Säure extrahierten und wieder präzipitierten Fasern den nativen ähnelten. Ebenso ist durch Hitze extrahiertes Kollagen dem säureextrahierten ähnlich (JACKSON und FESSLER[41]).

Auf Grund obiger Beobachtungen dachte man an eine Prägung der kollagenen Fibrillen durch die Mucopolysaccharide. MEYER, PALMER und SMITH[62] untersuchten ebenfalls Salzkomplexe aus sauren Proteinlösungen und Chondroitinschwefelsäure, in denen die Mucopolysaccharide anionisch, die Proteine kationisch gebunden sind. Chondroitinschwefelsäure ist in ähnlicher Weise an Kollagen gebunden wie Farbstoffanionen. Dies trifft für Hyaluronsäure z.B. nicht zu. Beide Mucopolysaccharide können jedoch mit löslichen Proteinen bei saurer Reaktion unlösliche Mukoide bilden.

NEMETH-CSOKA[71] fällte Fasern aus saurer Kollagen-Lösung mit Hilfe verschiedener saurer Mucopolysaccharide oder durch Dialyse; er konnte sie auf Grund ihrer Doppelbrechung polarisationsoptisch nachweisen. Die EBNERsche Phenolreaktion war positiv, d.h. die positive Doppelbrechung wurde in eine negative umgewandelt. Die Rivanolreaktion zeigte ebenfalls negative Doppelbrechung, was nach Ansicht dieses Autors auf eine orientierte Einfügung der sauren Mucopolysaccharide in die Fibrillen hinweisen soll. Durch Hyaluronidaseincubation konnte die Rivanolfärbung vermindert werden. Dies zeigt wiederum, dass Mucopolysaccharide herausgelöst wurden. Dagegen ändert sich bei Fibrillen, die mit Chondroitinsulfat B und Heparin gefällt wurden, nach Hyalu-

ronidase die Rivanolreaktion nicht, da beide sauren Mucopolysaccharide nicht auf dieses Enzym ansprechen.

In einer andern Versuchsreihe, in der er Haut mit Chondroitinsulfat oder Heparin injizierte,und am exzidierten Hautstück die Rivanolreaktion anstellte, war diese ebenfalls erhöht. Dies deutet gleichfalls auf eine orientierte Adsorption der Mucopolysaccharide an die Faser hin.

Da die sauren Mucopolysaccharide im allgemeinen keine spontane Tendenz zu fibrillärer Ausfällung zeigen, ist es wahrscheinlich, dass ihre orientierte Ausfällung und ihr Einbau in das submikroskopische Strukturgefüge der Fibrillen auf orientierend-konjugierende Einwirkung der fibrillär ausfallenden Eiweisskomponente zurückzuführen ist(NEMETH-CSOKA[71]).

PARTRIDGE[75] und NEMETH-CSOKA[72] beschreiben eine Beeinflussung der ersten Phase der Faserbildung durch Chondroitinsulfat. Es steuert die Ausbildung, ist aber keine wesentliche Bedingung für die Bildung der Fibrillenstruktur.

SYLVEN und AMBROSE[99] stellten aus proteinfreiem Natriumhyaluronat orientierte doppelbrechende Fasern her, die eine deutliche Querstreifung zeigen. Sie vermuten, dass dieses "self-orientation-Phänomen" auch in biologischen Systemen vorkommt und zwar bei der frühen Faserproteinbildung und beim Wiederaufbau kollagener Fasern.

Reaktionen zwischen Grundsubstanz und den kollagenen Fasern

Mucoproteine und Mucopolysaccharide beeinflussen das physiko-chemische Verhalten, Quellung, Permeabilität und Funktion der Faser. Eine Änderung in der Art der Bindung bringt eine veränderte Funktion und andere physiko-chemische Eigenschaften mit sich. Eine Faser kann nur mit intakter chemischer Struktur funktionieren. In den Nativfasern sind die verschiedenen Komponenten durch wirkliche chemische Bindungen oder durch van der Waalsche Kräfte zusammengehalten (BANGA und BALO[6]).

Kittsubstanzen schützen die Faser sozusagen vor Zustands-

änderungen, indem sie an der Faseroberfläche einen Film bzw. eine Membran bilden, die als Trennwand gegen ein Material mit verschiedenen Eigenschaften betrachtet werden kann. So können durch Zerstörung der hydrophilen Mucopolysaccharid-Proteingemische der interfibrillären Kittsubstanz Wasser und Ionen in die Faser eindringen (LINDNER[56]). Dieses Wasser drängt die Hauptketten so weit auseinander wie es die H-Brücken in den Zwischenbrücken erlauben.So bekommen die geladenen Seitenketten mehr Platz, wodurch sich dann die Hauptketten aufrichten können.

Erst wenn die molekularen Bindungen durch das eingedrungene Wasser zerstört sind, treten irreversible, die Faser auflösende Veränderungen auf. LETTERER[52] unterscheidet so zwischen einer Aufsplitterung, die durch obige Vorgänge bedingt ist und einer Verquellung der Fasern.

Für die Zugfestigkeit der Faser hat die Kittsubstanz eine wesentliche Bedeutung. Bei Skorbut ist nicht das Kollagen verändert, sondern die Kittsubstanz. Hierdurch kann das Aufbrechen von Narben bei dieser Erkrankung erklärt werden (WASSERMANN[110]).

Der Mucopolysaccharidfilm der Mikrofibrillen wirkt als Schutzkolloid. Dies ist der Grund, weshalb sich die Fasern nach Hyaluronidaseincubation in Säuren 3 mal so rasch auflösen (JACKSON[38]).

Als weiteren Beweis dafür, dass die Fasern von mucopolysaccharidhaltiger Kittsubstanz umgeben sind, gilt die veränderte Anfärbbarkeit sowie die andere elektronenoptische Darstellbarkeit von kollagenen und retikulären Fasern nach Hyaluronidasebehandlung (TELKKÄ und KULONEN[102]; GIBIAN[24]).

Die histologischen Unterschiede zwischen kollagenen und retikulären Fasern liegen in der verschiedenen Konstitution der Kittsubstanzen (SCHWARZ[94]).

Die stabilisierende Rolle der sauren Mucopolysaccharide auf die Fibrillenstruktur kann nach NEMETH-CSOKA[71] auf 2 verschiedene Arten erklärt werden:

1. Wenig saure Mucopolysaccharide sind fest, enzymresi-

stent an das Eiweissgefüge der Faser gebunden und so der polarisationsoptischen Untersuchung unzugänglich. Dieser Anteil trägt zur Stabilisierung der Fibrillen bei. Der andere Anteil ist fermentativ herauslösbar und somit ohne Einfluss auf die Struktur.

2. Saure Mucopolysaccharide sind nicht in das Eiweissstrukturgefüge eingebaut, sondern sie begünstigen nur eine bessere Möglichkeit zur Bindung präzipitierter Eiweissmoleküle.

Diese stabilisierende Rolle der sauren Mucopolysaccharide untersuchte JACKSON[39] an Hand der Hitzekontraktion: nach Hyaluronidasebehandlung sinkt die Temperatur derselben von 67°C auf 53°C.

Die Interzellularsubstanz erreicht in jedem Organ ein endgültiges Differenzierungsniveau, das sie das ganze Leben über behält. Dieser Zustand entspricht dem funktionellen Charakter des Organs (SCHWARZ[94]).

Als primäre Folge chemischer und mechanischer Schädigungen der kollagenen Faser tritt eine Störung der Faser-Kittsubstanz-Beziehungen ein (LINDNER[56]).

Zwischen geformten und ungeformten Anteilen der interzellularen Komponenten des Bindegewebes kann man keine wohldefinierte Grenzlinie mehr ziehen, wenn man die engen Zusammenhänge zwischen Grundsubstanz und Fasern bedenkt, besonders was die Fibrillogenese betrifft. Aus diesem Grunde darf man auch bei der Beurteilung der Fasereigenschaften Polypeptid- und Mucopolysaccharidanteile nicht getrennt betrachten. Ihr inniger Zusammenhang ist die Grundlage für Struktur und Funktion der Faser. DELAUNEY und BAZIN[16] nehmen daher als Ursache der Kollagenkrankheiten eine mangelhaft gewordene Bindung zwischen Kollagenprotein und Mucopolysacchariden an. Dabei können diese Autoren aber noch keine näheren Angaben über die Verbindungsbrücke zwischen der Faser und der Grundsubstanz geben.

Bei unseren Untersuchungen fanden wir zunächst, dass sich der zur Beurteilung der Phenolreaktion an der kollagenen Faser von MISSMAHL[64) 65) 66)] aufgestellte Faktor $\frac{a+b}{a}$ durch

die Behandlung kollagenen Bindegewebes der Haut mit Hyaluronidase verändert. Der Mittelwert des Faktors $\frac{a+b}{a}$ ist bei der unbehandelten menschlichen Haut in unseren Versuchen 1,48 $\pm$ 0,177. Nach Hyaluronidaseincubation finden wir einen Faktor von 1,34 $\pm$ 0,201. Diese Differenz ist statistisch gesichert (Tabellen IV und VI).

Die Phenolreaktion spielt sich an den kollagenen Fasern ab und zwar lagert sich Phenol an den hydrophilen Gruppen der Eiweissketten ab. Eine zusammenfassende Beschreibung dieser Anlagerungsmöglichkeiten finden wir bei BETZ[10].

Die Hyaluronidasen sind substratspezifisch. Sie depolymerisieren vor allem Hyaluronsäure, aber auch einige andere Mucopolysaccharide. Da in der Haut hauptsächlich Hyaluronsäure vorkommt, wird diese also von dem Ferment angegriffen. Wenn man die Substrate der Hyaluronidasen als Mischpolymerisate aus Glucuronsäure A und Hexosamin B betrachtet, so kann man sich das Auftreten der fermentativen Depolymerisation an 2 verschiedenen Bindungen vorstellen: zwischen A und B und zwischen B und A. Das Ferment greift immer in Substratmitte an und zwar öffnet es nur einen Typ von glykosidischen Bindungen. Dies wird dadurch bewiesen, dass das Verhältnis von Reduktions- und Acetyl-Hexosamin-Werten konstant bleibt; denn durch Fermentaktivität entstehen reduzierende Gruppen (GIBIAN[24]).

Bei unseren relativ hochkonzentrierten Hyaluronidaselösungen kann die proteinschädigende Wirkung von Formol, das auch auf Hyaluronidase inaktivierend wirken soll, keinen Einfluss haben (GIBIAN[24]).

Die sauren Mucopolysaccharide sind im Nativzustand an Protein gebunden und zwar können sie auf Grund ihrer Uronsäurekomponente als Anionen wirken. Diese verbinden sich mit den kationischen Gruppen der Proteine zu Salzkomplexen (WERLE und AMANN[112], BADIN und SCHUBERT[4]). Die Fixierung der Anionen an Kollagen wird nur durch die stark sauren Gruppen bestimmt, also vorwiegehd durch die Sulfatgruppen. Ausser der salzartigen Bindung können auch H-Brücken und

Valenzbindung auftreten. Chondroitinsulfat und saure Farbstoffe können sich bei der Anlagerung an Kollagen kompetitiv hemmen (EINBINDER und SCHUBERT[19], MEYER, PALMER und SMITH[62]). KULONEN und LOEVEN[46] nehmen eine komplexe Bindung von Mucopolysacchariden und Kollagen in der Mikrofibrille an.

Bei unseren Versuchen wird der Faktor $\frac{a+b}{a}$ nach Hyaluronidasebehandlung kleiner; das bedeutet, dass sich weniger Phenol an die Faser anlagern kann. Es werden also durch die Depolymerisationsprodukte hydrophile Stellen am Kollagenprotein besetzt oder mit andern Worten ausgedrückt, Spaltprodukte der Grundsubstanz können sich mit der kollagenen Faser verbinden. Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine kompetitive Hemmung zwischen Phenolmolekülen und Depolymerisationsprodukten.

Die Spaltprodukte der Mucopolysaccharide können sich dabei mit ihren freien OH^--,$COOH^-$-und Sulfatgruppen an verschiedene Stellen der Kollagenfaserproteine anlagern: So kann man sich z.B. die Bildung einer H-Brücke zwischen der peptidischen C=O-Gruppe und den Mucopolysaccharid-Bruchstücken vorstellen. Ebenso kann die OH-Gruppe Anlagerungsmöglichkeiten bieten. Eine ähnliche Bindung ist an freien NH_2-Gruppen von Aminosäuren möglich. Weiterhin können sich die Depolymerisationsprodukte auch an die OH-Gruppe von Oxy-Prolin anlagern. Diese ragt aus der Eiweisskette heraus und ist so frei zugänglich. Letztlich besteht noch die Möglichkeit, dass sich das Phenol an die an Kollagen gebundenen Mucopolysaccharide anlagert und dass dies nach der Depolymerisation der Mucopolysaccharide nicht mehr überall möglich ist.

Da es uns am wahrscheinlichsten erschien, dass die Sulfatgruppen der Spaltprodukte aus der Grundsubstanz die wesentlichen Verbindungsglieder zur Faser bilden, untersuchten wir das Verhalten der Phenolreaktion nach Zugabe von Heparin, Chondroitinsulfat und SP 54^R. Dabei ernielten wir an der Haut von Erwachsenen folgende Ergebnisse: Durch die Anlagerung von Heparin an die kollagene Faser

nach Hyaluronidasebehandlung kommt es zu einer weiteren Verkleinerung des Faktors $\frac{a+b}{a}$ (Tabellen I,II, IV, V und Abb. 9).Das bedeutet, dass sich jetzt noch weniger Phenol an die Faser anlagern kann als dies nach reiner Hyaluronidasebehandlung der Fall ist. Die Werte der positiven Doppelbrechung in wässerigem Heparin entsprechen demgegenüber denen ohne Heparin. Bei einigen Hautpräparaten stiegen die anfänglich niederen Werte der negativen Doppelbrechung nach 3-4 Minuten auf höhere Werte an. Wir verwendeten die ersten Ergebnisse.

Man kann sich eine Anlagerung dieser grossen Mucopolysaccharid-Moleküle auf Grund der Untersuchungen von THIELE[103] folgendermassen erklären:
Zwischen den Fadenmolekülen der Faserproteine und den Mucopolysaccharid-Molekülen besteht eine Potentialdifferenz. Die Heparinmoleküle werden dadurch im elektrischen Feld parallel zur Proteinoberfläche angeordnet und in dieser so entfalteten Anordnung fixiert. THIELE arbeitete mit ungeordneten Fadenmolekülen, von denen nur die kleinen positiven Gegenionen durch eine Gelmembran hindurch können, nicht aber die grossen (Abb. 16). Durch die entstehende Potentialdifferenz werden die Moleküle geordnet und zwar

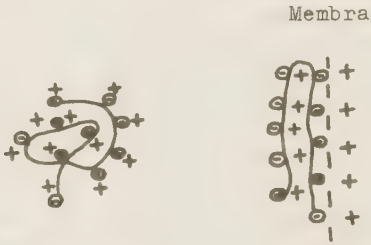

Abb. 16 : Orientierung von Molekülen, die sich ursprünglich in ungeordneten Knäueln befinden (links), an einer Membran.

parallel zur Membranoberfläche. Die Ordnung ist abhängig von der Zahl und Art der ionischen Gruppen an den Fadenmolekülen, von der Stärke der Ladung, von Dissoziation, Kettenlänge und Konzentration des Fadenmoleküls, von Radius und Valenz der Gegenionen. Die Gesamtdoppelbrechung setzt sich zusammen aus Parallelordnung, Form- und Eigendoppelbrechung, Quellungsgrad und Hydratation. Zu viele Ionen führen zu einer stärkeren Hydratisierung, was dann eine Quellung zur Folge hat. Durch Eindiffundieren von H-Ionen können Fadenmoleküle als Symplexe, das sind Salze aus Polyanionen und Polykationen, geordnet werden. Dies hat eine grosse Bedeutung bei Wachstumsvorgängen. Im jungen wachsenden Organismus findet man sie häufiger mit einem höheren Anteil an Polyuronid oder Mucopolysacchariden. Im Alter nehmen dann Hydrophilie und Quellbarkeit ab.

Bei einer derartigen Heparinanlagerung an die Kollagenfaser kann sich nur noch wenig Phenol mit freien Fasergruppen verbinden.

Unsere Untersuchungsergebnisse stehen z.T. im Gegensatz zu den Experimenten von NEMETH-CSOKA[71] . Nach ihm bewirkt eine Veränderung der Grundsubstanz keine Veränderung der Phenolreaktion. Er arbeitete allerdings mit durch Chondroitinschwefelsäure gefällten Fasern. Dieses Nichtansprechen der Phenolreaktion auf qualitative und quantitative Veränderungen in der Grundsubstanz sieht NEMETH-CSOKA als Beweis für das fibrilläre System des Kollageneiweisses an. Bei seinen Versuchen mit Testeshyaluronidase auf präzipitierte Fibrillen stellte er fest, dass die Rivanolreaktion mit zunehmender Einwirkungsdauer abnimmt. Umgekehrt steigt sie an bei mit Heparin oder Chondroitinsulfat injizierter Haut. Diese Erhöhung weist auf eine orientierte Adsorption der sauren Mucopolysaccharide an die Faser hin.

LINDNER[55] berichtete neuerdings über die percutane Resorption von Heparin, welche er durch das Auftreten metachromatischer Makrophagen nachwies.

Mit Chondroitinsulfat konnten wir gleichfalls eine Erniedrigung des Faktors $\frac{a+b}{a}$ finden (Tab. I,II,IV,V;Abb. 13).

Auch an der geringeren Zahl von Versuchen mit SP 54^{R}, einem Heparinoid, war eine Abnahme des Faktors deutlich zu erkennen (S. 38-39).

Da sowohl Heparin als auch die beiden hier erwähnten Substanzen viele Sulfatgruppen enthalten, muss man an eine Bindung über diese Gruppen denken. Möglicherweise lagern sich diese Sulfatgruppen an die basischen Gruppen der Proteinketten an, also an entgegengesetzt geladene Gruppen. Das Molekül muss damit also in das Faserinnere eindringen und mit den einzelnen Ketten des Proteins reagieren. GUSTAVSON[31] machte Versuche mit Lignosulfonsäure, die mehr als 20 anionische Zentren im Molekül enthält. Sie verbindet sich stöchiometrisch mit Protein und inaktiviert dessen basische Gruppen völlig. Das Eindringen in das Innere der Kollagenfibrille wird vielleicht durch das Wechselspiel zahlreicher anionischer Zentren im Molekül ermöglicht. SCHNEIDER u.a.[92] wiesen auf "Zuckerbrücken" der Mucopolysaccharide im Kollagen hin, die mit dem Carboxylende der Peptidkette esterartig, mit dem Aminoende N-glykosidisch verbunden sind.

Bereits aus diesen Befunden ergibt sich, dass Heparin und entsprechende Sulfatgruppen tragende Spaltprodukte an die kollagene Faser angelagert werden können. Einen weiteren Hinweis hierauf geben unsere Untersuchungen über das Verhalten der Metachromasie mit Toluidinblau.

Wie alle hochmolekularen Polyschwefelsäureester $R\text{-}(OSO_3H)_n$ zeigt auch Heparin Metachromasie (HIGGINBOTHAM[33] und BUNTING[11]), die als spezifischer Nachweis für saure Mucopolysaccharide dient. Das Gewebe färbt sich dabei in einem andern Ton als es dem Farbstoff entspricht an. Über die Grundlagen der Metachromasie sei auf Spezialliteratur verwiesen (MISSMAHL[67], SYLVEN[100], LEVIN und SCHUBERT[53], SCHUBERT und LEVIN[93]). Hier sollen nur grundsätzliche Züge erwähnt werden:

1. Der wesentliche Faktor für das Auftreten von Metachromasie ist die gerichtete Einlagerung der Farbstoffmoleküle (MISSMAHL[67]), die durch hydrophobe und hydrophile

Teile im Molekül begünstigt wird.

2. Die möglichst dichte Verteilung der elektronegativen oberflächlichen Ladungen am Substrat bestimmt die Anlagerung der Farbmoleküle und den Grad der Metachromasie. Ein Abstand von 5 Å ist Voraussetzung. Polysaccharide, die pro Disaccharideinheit 1 OSO_3H und Uronsäure enthalten, haben entlang der Ketten Abstände von 4 - 5 Å zwischen den Ladungen und zeigen daher ziemlich stabile Metachromasie. Bei maximaler Polymerisation, die mit einer entsprechenden Festigkeit des Bindegewebes verbunden ist, liegt nur eine geringe Metachromasie vor, da sie erst dann auftritt, wenn Mucopolysaccharide im Überschuss vorhanden sind oder wenn deren Bindung an Eiweiss gelöst ist (LETTERER[51]).

Da bei unseren Untersuchungen nach Zugabe von Heparin, Chondroitinsulfat und SP 54^R zu der durch Hyaluronidase von Grundsubstanz befreiten kollagenen Faser eine intensive Metachromasie mit Toluidinblau auftritt, müssen wir annehmen, dass diese Spaltprodukte gerichtet an die Fasern angelagert werden. Offensichtlich besitzt dabei das von uns untersuchte Prokollagen weniger zur Anlagerung und Ausrichtung dieser Substanzen geeignete Gruppen. Wir fanden hier nämlich wesentlich schwächere Metachromasie.

Werden die mit Heparin und Chondroitinsulfat behandelten Schnitte gewässert oder mit Protaminsulfat behandelt, wie dies bei Heparin und SP 54^R der Fall war, so steigt der Faktor $\frac{a+b}{a}$ wieder ungefähr auf die Ausgangswerte an, also auf die $\frac{a+b}{a}$-Werte vor der Einwirkung von Hyaluronidase (Tab.I, II,IV,V und Abb.11,13). Das bedeutet, dass die Bindung zwischen den Fasern und den einzelnen Mucopolysacchariden relativ lockerer sein muss als ihre Bindung an Protaminsulfat. Die Werte der positiven Doppelbrechung in wässriger Lösung, sowohl bei gewässerten Heparin- und Chondroitinsulfat-Schnitten als auch bei Protaminlösungen , entsprechen denen vor Mucopolysaccharideinwirkung.

Das Prokollagen ist in stärkeren und schwächeren Fibrillen abgelagert. Sie entsprechen etwa jenen der Kollagen-

fasern in der Cutis. Bei blosser Betrachtung zwischen gekreuzten Polars fällt bereits auf, dass die Doppelbrechung dieser Fibrillen relativ schwach ist; sie ist jedoch völlig eindeutig zu erkennen. Dieser Befund wird durch unsere Messungen bestätigt, bei denen wir für die Gangunterschiede der Doppelbrechung kleinere Werte fanden als an entsprechenden Fibrillen der Haut.

Entgegen der Annahme von KÜHN, HOFFMANN und GRASSMANN[45], dass sich Tropokollagen, das unter physiologischen Bedingungen als lösliche Vorstufe von Kollagen betrachtet wird, in 80% Phenol völlig löse, konnten wir an Prokollagen (das man mit Tropokollagen als identisch betrachten kann) die Phenolreaktion auslösen. Wir erhielten aber sehr niedrige Werte der negativen Doppelbrechung. Ein Teil der Fasern hat sich sicher aufgelöst, denn man konnte die Reaktion nicht an allen anfänglich vorhandenen Fasern auslösen.

Das Säuglingskollagen weist gegenüber dem von Erwachsenen einen statistisch gesichert höheren Faktor auf mit 1,54 $\pm$ 0,204. (Tab. VI). Dies kommt von der verminderten Anzahl der H-Brücken her, wodurch den Phenolmolekülen bessere Anlagerungsmöglichkeiten gegeben sind (BETZ[10]).

Durch Hyaluronidaseincubation sinkt der Faktor ungefähr auf den entsprechenden Wert bei Erwachsenen; das bedeutet, dass er insgesamt stärker abnimmt als bei Erwachsenen. Auf Grund der graphischen Darstellungen in den Abbildungen 10, 12, 14 finden wir nach Heparin- und Chondroitinsulfatbehandlung denselben Abfall der Werte wie bei Erwachsenen und entsprechend nach Wässern und Incubation mit Protaminsulfat wieder einen Anstieg auf ungefähr die Ausgangswerte. Diese Ergebnisse konnten jedoch bis jetzt mit unseren Versuchsreihen nicht ausreichend statistisch gesichert werden.

Im jungen wachsenden Gewebe überwiegt die Grundsubstanz die kollagenen Faser, im Alter nehmen dagegen die faserigen Bestandteile zu. Nach Hyaluronidasebehandlung können sich nun mehr Mucopolysaccharid-Depolymerisationsprodukte an die Fasern anlagern und so die Bindungsmöglichkeiten für Phenol herabsetzen.

An unfixierten Schnitten war keine Phenolreaktion auszulösen, da sich die Fasern sofort aufgelöst haben. Es fehlt hier also die Fibrillen stabilisierende Wirkung von Formalin.

Die Rivanolreaktion, die NEMETH-CSOKA[71)] auf die mukoide Strukturkomponente der kollagenen Faser zurückführt, verlief bei unseren Untersuchungen nur bei 0,1 molarer wässriger Rivanollösung positiv, nicht aber bei der Anwendung von Puffern. Man kann sich dies damit erklären, dass der Farbstoff durch die Puffer, die in diesem Fall als Salzlösung mit hoher Dielektrizitätskonstanten wirken, so stark aggregiert wird, dass er nicht mehr ausreichend reagieren kann. Einige Schnitte zeigten jedoch bei pH 6,2 eine sehr schwache negative Doppelbrechung. Nach 20 minütigem Wässern werden alle zuvor negativ doppelbrechenden Schnitte wieder positiv. Die Schnitte selbst sind fast völlig entfärbt bis auf die Epithelschicht und wenige Fasern direkt unter dem Epithel.Auch Hyaluronidaseeinwirkung hat keinen Einfluss auf die rivanolbedingte Umkehr der Doppelbrechung. Bei einer Wellenlänge von 480 mμ ist die Doppelbrechung am intensivsten zu beobachten.

NEMETH-CSOKA[71)] ist auf Grund seiner Untersuchungsergebnisse der Ansicht, dass die Bindefähigkeit der angewandten Farbstoffe von der Polymerität der Grundsubstanz abhängig ist. Wo diese depolymerisiert worden ist, fehlt die orientierte Aggregation des Farbstoffes. Er gibt eine proportionale Abhängigkeit der Reaktion vom Mukoidgehalt an. Auch sank bei ihm die Stärke der Rivanolreaktion nach Hyaluronidasebehandlung.

Bei 2 Häuten von Patienten, die an einem malignen Tumor gestorben waren, hatte sich der Schnitt nach Färbung mit 0,1 molarem Rivanol kaum angefärbt. Dies muss mit einer durch das Neoplasma bedingten Strukturänderung von Faser und Grundsubstanz zusammenhängen.

Bei einigen unserer Häute von Patienten mit Neoplasmen waren die Faktoren vor jeglicher Behandlung, also die Werte oH, niedriger als nach Hyaluronidasebehandlung. Es

konnte sich also weniger Phenol anlagern. Die Werte der negativen Doppelbrechung waren bei diesen einzelnen Fällen extrem niedrig. An einigen Stellen waren die Fasern ganz verschwunden. Ähnliche Effekte nach Phenol konnten wir auch bei mit Heparin und Chondroitinsulfat behandelten Schnitten beobachten, nicht dagegen, wenn die beiden letzteren gewässert wurden.

Wenn man an diesen Häuten nach monatelanger Fixierung die Phenolreaktion am unbehandelten Präparat macht, so fällt jetzt eine Stabilisierung der Fasern auf, was sich an einer Phenolreaktion wie an normalen Präparaten bemerkbar macht.

Beim Hautkollagen eines Patienten mit einem Rundzellensarkom fanden wir extrem niedrige Faktoren nach Hyaluronidasebehandlung, nach Heparin und Chondroitinsulfat. Dasselbe gilt für 2 Fälle mit Urämie.

Diese eben erwähnten Befunde an kollagenen Fasern von Patienten mit Neoplasmen bzw. schweren Urämien weisen darauf hin, dass durch die von uns durchgeführten Untersuchungen nicht nur der Nachweis einer Anlagerung von Spaltprodukten der Grundsubstanz an kollagene Fasern erbracht wurde, sondern darüber hinaus sich Hinweise darauf ergeben, dass bei krankhaften Zuständen diese Verbindungen zwischen Grundsubstanzbestandteilen und Fasern gestört sein können.

Zusammenfassung

1.) Bei unseren Untersuchungen bestätigte sich, dass mit Hilfe des von MISSMAHL aufgestellten Faktors $\frac{a+b}{a}$ die v. EBNERsche Phenolreaktion an der kollagenen Faser quantitativ ausgewertet werden kann. Der Wert für diesen Faktor betrug in unserer Versuchsreihe am kollagenen Gewebe der Cutis

bei Erwachsenen : $1{,}48 \pm 0{,}177$
bei Säuglingen : $1{,}54 \pm 0{,}204$.

2.) Durch Behandlung des kollagenen Gewebes mit Hyaluronidase kommt es sowohl bei Erwachsenen als auch bei Säuglingen zu einem statistisch gesicherten Absinken des Faktors. Er betrug:

bei Erwachsenen : $1{,}34 \pm 0{,}201$
bei Säuglingen : $1{,}37 \pm 0{,}222$.

3.) Zugabe von Heparin und Chondroitinsulfat zu der durch Hyaluronidase von ihrer Grundsubstanz entblössten kollagenen Faser führt zu einem weiteren Absinken des Faktors. Unsere Werte hierfür betragen:

bei Erwachsenen für Heparin : $1{,}27 \pm 0{,}174$
für Chondroitinsulfat: $1{,}27 \pm 0{,}192$
bei Säuglingen für Heparin : $1{,}28 \pm 0{,}081$
für Chondroitinsulfat: $1{,}29 \pm 0{,}183$.

4.) Bei unseren Untersuchungen mit SP 54^{R} ergab sich ebenfalls ein gegenüber lediglich mit Hyaluronidase behandelten Fasern erniedrigter Wert. Eine statistische Sicherung kann hier jedoch wegen der kleinen Anzahl von Versuchen nicht gegeben werden.

5.) Durch Wässern oder Behandlung mit Protaminsulfat kommt es an der mit Heparin bzw. Chondroitinsulfat behandelten Faser zu einem Anstieg des Faktors.

6.) Prokollagen gibt lediglich eine schwache Phenolreaktion. Der Faktor entspricht jedoch den Werten des normalen Hautkollagens.

7.) Die durch Hyaluronidase von der Grundsubstanz befreite kollagene Faser gibt mit Toluidinblau keine Metachromasie.

8.) Nach Zugabe von Heparin zu der mit Hyaluronidase behandelten kollagenen Faser tritt an dieser wieder Metachromasie auf. Diese metachromatische Anfärbung ist deutlicher als jene an der unbehandelten Faser.

9.) Im Gegensatz zu NEMETH-CSOKA erhielten wir lediglich mit wässriger Rivanollösung Umkehr der Doppelbrechung an der kollagenen Faser. Mit gepufferten Rivanollösungen konnten wir diese niemals erzielen.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, dass sulfatgruppentragende Teilstücke der Grundsubstanz (Heparin, Chondroitinschwefelsäure) direkt mit der kollagenen Faser in Verbindung treten können.

L i t e r a t u r ü b e r s i c h t

1.) ALBURN,H.E. u. WHITLEY,R.W. : Factors affecting the assay of Hyaluronidase. J.Biol.Chem.192: 379 (1951).

2.) ANDERMAUR,M. u. BRODHAGE,H.: Morphologische und eiweisschemische Untersuchungen am normalen Kniegelenk. Ärztl. Forschung 10 I: 129 (1956).

3.) ASBOE-HANSEN,G. u. IVERSEN,K.: Influence of thyrotrophic hormone on connective tissue pathogenetic significance of mucopolysaccharides in experimental exophthalmos. Acta endocrin. 8: 90 (1951).

4.) BADIN,J. u. SCHUBERT,M.: Conditions of formation of euglobulinlike precipitates from serum proteins and chondroitin sulfate. J.Clin.Investig.34: 1312 (1955).

5.) BAHR,G.F. 1952, zit. bei FREY-WYSSLING[20].

6.) BANGA,I., BALO,J.: The structure and chemical composition of connective tissue. In:Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957 p.254.

7.) BANGA,I.,BALO,J. u. SZABO,D.: Contraction and relaxation of collagen fibers. Nature 174: 788 (1954).

8.) BEAR,R.S.: The structure of collagen fibrils.In: Advances in Protein Chemistry 7: p.69 (1952).

9.) BENSLEY,S.H.: Histological studies of the reactions of cells and intercellular substances of loose connective tissue to the spreading factor of testicular extracts. Ann.New York Acad.Sci.52: 983 (1950).

10.) BETZ,G.: Quantitative Auswertung der EBNERschen Phenolreaktion an der kollagenen Faser. Inaugural-Dissertation 1963 Tübingen.

11.) BUNTING,H.: The distribution of acid mucopolysaccharides in mammalian tissues as revealed by histochemical methods. Ann.New York Acad.Sci.52:977(1950).

12.) BUNTING,H.u. WHITE,R.F.: 1950 zit. bei WASSERMANN[108].

13.) CHARLES,A.F. u. SCOTT,D.A.: Studies on heparin. I.The preparation of heparin. II.Heparin in various tissues. J.Biol.Chem.102: 425 und 531 (1933).

14.) CLEAN,D.Mc. u. HALE,C.W.: Mucinase and tissue permeability. Nature 145: 867 (1940).
15.) DAY,T.D. 1949: zit. bei WASSERMANN[108].
16.) DELAUNEY,A. u. BAZIN,S.: Combinations in vitro collagène-mucopolysaccharides et modifications apportées à ces combinaisons par des sels et des polyosides bactériens. In: Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957 p.105.
17.) DURAN-REYNALS,F.: Alte und neue Erkenntnisse über die mesenchymale Grundsubstanz. Die Medizinische 1954,1 pp. 532-35 u. 595-98.
18.) EHRLICH,P. 1879: zit. bei RILEY[85].
19.) EINBINDER,J. u. SCHUBERT,M.: Binding of mucopolysaccharides and dyes by collagen. J.Biol.Chem. 188: 335 (1951).
20.) FREY-WYSSLING,A.: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologica 2 A: 1 (1955).
21.) GENTELE,H. u. HOLMGREN,H.J. 1951: zit. bei GIBIAN[24].
22.) GERSH,I. 1951: zit. bei WASSERMANN[108].
23.) GESCHICKTER,Ch.F.,PANAYIOTA,A.,ATHANASIADON,M.D. u. O'MALLEY,W.E.: The role of mucinolysis in collagen disease. Americ.J.Clin.Path. 30: 93 (1958).
24.) GIBIAN,H.: Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen. Einzeldarstellungen aus dem Gesamtgebiet der Biochemie. Wien 1959, Band 4 p.1.
25.) GÖMÖRI 1937: zit. bei KÜHN,HOFMANN,GRASSMANN[45].
26.) GRASSMANN,W.: zit. bei LINDNER,v.SCHWEINITZ,FREYTAG[56].
27.) GRASSMANN,W.: zit. bei SCHWARZ[94].
28.) GROSS,J.: Influence of time on the reversible association between large molecules: the collagen system. Nature 181: 556 (1958).
29.) GROSSFELD,H.,MEYER,K.,GODMAN,G. u. LINKER,A.: 1957: zit. bei HIGGINBOTHAM[33].
30.) GUSTAVSON,K.H.: Some new aspects of the stability and reactivity of collagens. In: Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957 p. 185.

31.) GUSTAVSON,K.H.: Irreversible inactivation of the cationic groups of collagen by high-molecular acids. Nature 169: 757 (1952).

32.) HARRINGTON,W.F. u. v.HIPPEL,P.H.: The structure of collagen and gelatin. In: Advanc. in Prot.Chem. 16: p.1 (1961).

33.) HIGGINBOTHAM,R.D.: On the participation of micellophagosis in the resistance of tissue to injurious agents. Intern.Arch. of Allerg. 15: 195 (1959).

34.) - u. DOUGHERTY,T.F.:1957: zit. bei HIGGINBOTHAM[33].

35.) HIGHBERGER,J.H.: zit. bei JACKSON, FESSLER[41].

36.) - ,GROSS,J. u. SCHMITT,F.O. 1951: zit. bei MORRIONE[68].

37.) HOLMGREN,H. u. WILANDER,O. 1937: zit. bei RILEY[85].

38.) JACKSON,D.S.: zit. bei WASSERMANN[110].

39.) - : zit. bei NEMETH-CSOKA[72].

40.) - u. BALL,J.: A soluble form of reconstituted collagen. Nature 172: 1046 (1953).

41.) - u. FESSLER,J.H.: Isolation and properties of a collagen soluble in salt solution at neutral pH. Nature 176: 69 (1955).

42.) JACKSON,S.F.: Structural problems associated with the formation of collagen fibrils in vivo. In: Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957 p.77.

43.) KEINING,E. u. BRAUN-FALCO,O.: Vergleichende Betrachtungen über das Keloid, Sklerödem und myxödematöse Hautveränderungen. Dermat. Wochenschr. 126: 633 (1952).

44.) KLINGENBERG,H.G.: Der Einfluss des Heparins auf die Wundheilung. Arzneimittelforschung 2: 120 (1952).

45.) KÜHN,K.,HOFMANN,H. u. GRASSMANN,W.: Querstreifung und Perjodat-Silberurotropin-Reaktion bei verschiedenen Kollagenarten. Zeitschr. Naturforsch. 11b: 581 (1956).

46.) KULONEN,E. 1951 u. LOEVEN,W.A. 1955: zit. bei WASSERMANN[110].

47.) KÜNTZEL,A. 1941: zit. bei WASSERMANN[108].

48.) LANGE,J.,PLOHNKE,K.: Künstliche Ordnung von Makromolekülen und natürlichen Texturen. Zeiss-Mitteilungen 2: 246 (1962) 7.Heft.

49.) LANGECKER,H.: Ein Beitrag zur Bestimmung der Hyaluronsäure in Organen. Klin.Wochenschr. 30: 222 (1952).

50.) LAYTON,L.: Importance of the synthesis of acidic polysaccharide for wound healing. Nature 181: 1543 (1958).

51.) LETTERER,E.: Allgemeine Pathologie des Bindegewebes. Verhandl.Kongr.Innere Med. 65: 9 (1959).

52.) - zit. bei WASSERMANN[110].

53.) LEVINE,A. u. SCHUBERT,M.: Metachromasy of thiazine dyes produced by chondroitin sulfate. J.Americ.Chem.Soc. 74,1: 91 (1952).

54.) LINDNER,J.: Histochemische und biochemische Untersuchungen der traumatisch gestörten Bindungen zwischen Grundsubstanz und Kollagenfasern. Verh.Deutsch. Gesellsch.Path. 43. Tagung 1959 p.61.

55.) - : Die perkutane Resorption von Heparin. Med.Klinik 34: 1376 (1963).

56.) - ,GRAF v. SCHWEINITZ,H.A., FREYTAG,G.: Reaktionsformen von Kollagenfasern. Acta histochem. 9: 231 (1960).

57.) MATHEWS,M.B., DORFMAN,A.: Effect of heat and pH on Hyaluronidase. J.Biol.Chem. 206: 143 (1954).

58.) - ,LOZAITYTE,I. 1958: zit. bei GIBIAN[24].

59.) MECKAUER,M. 1836: zit. bei WASSERMANN[108].

60.) MEYER,K. u. COHEN,S.S. 1942: zit. bei WASSERMANN[108].

61.) - ,DAVIDSON,E.,LINKER,A. u. HOFFMANN,P.: The acid mucopolysaccharides of connective tissue. Biochim. Biophys.Acta 21: 506 (1956).

62.) - ,PALMER,J., SMYTH,E.: On glycoproteins. V. Protein complexes of chondroitin sulfate. J.Biol.Chem. 119: 561 (1937).

63.) - ,SMYTH,E., PALMER,J.: zit. bei WASSERMANN[110].

64.) MISSMAHL,H.P.: Nachweis gerichtet eingelagerter Lipoide in die retikuläre Faser und neue Untersuchungen über das Verhalten der retikulären Faser im Krankheitsgeschehen, insbesondere bei der Amyloidose. Habilitationsarbeit 1958 Tübingen.

65.) - : Bedeutung und Möglichkeiten der Polarisationsmikroskopie in der Medizin. Bericht der oberhess. Ges. f. Natur- und Heilkunde zu Giessen NF Naturwissenschaftl. Abt. 27: 32 (1954).

66.) - : Quantitative Auswertung der Phenolreaktion an der kollagenen Faser. Acta histochem. Im Druck.

67.) - : Metachromasie durch gerichtete Zusammenlagerung von Farbstoffteilchen, erläutert am optischen Verhalten des Toluidinblau. Histochemie. Im Druck.

68.) MORRIONE,T.G.: The formation of collagen fibers by the action of heparin on soluble collagen: an electron microscope study. J.Exp.Med. 96: 107 (1952).

69.) NAGEOTTE,J. 1927: zit. bei HARRINGTON[32].

70.) NECKEL,J. 1951; KRÜGER,F. u. WOHLFAHRT-BOTTERMANN,K.E.: beide 1952: zit. bei FREY-WYSSLING[20].

71.) NEMETH-CSOKA,M.: Über die submikroskopische Struktur der in vitro präzipitierten kollagenen Fasern und die stabilisierende Rolle der sauren Mucopolysaccharide. I. Teil. Acta histochem. 9: 282 (1960).

72.) - : Untersuchung über kollagene Fasern. II. Teil. Acta histochem. 12: 255 (1961).

73.) NORTH,A.C.T., COWAN,P.M. u. RANDALL,J.T.: Structural units in collagen fibrils. Nature 174: 1142 (1954).

74.) ORECHOWITSCH,V.N.: zit. bei KÜHN, HOFMANN, GRASSMANN[45].

75.) PARTRIGE,S.M. 1948: zit. bei BEAR[8].

76.) PAULING,L., COREY,R.B. u. BRAUNSON,H.R.: The structure of proteins: two hydrogenbonded helical configurations of the polypeptid chain. Proc.Nat.Acad. Sci. 37: 205 (1951).

77.) PAULING,L. u. COREY,R.B.: Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptid chains. Proc.Nat.Acad.Sci. 37: 235 (1951).

PAULING,L. u. COREY,R.B.: The structure of synthetic polypeptides. Proc.Nat.Acad.Sci. 37: 241 (1951).

PAULING,L. u. COREY,R.B.: The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. Proc. Nat.Acad.Sci. 37: 251 (1951).

PAULING,L. u. COREY,R.B.: The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group. Proc. Nat.Acad.Sci. 37: 272 (1951).

78.) POLICARD,A.: Position actuelle du problème de la substance fondamentale conjonctive. Presse Méd. 62: 343 (1954).

79.) PORTER 1952: zit. bei WASSERMANN[108].

80.) RAMACHANDRAN,G.N. u. KARTHA,G.: Structure of collagen. Nature 174: 269 (1954).

81.) RANDALL,J.T.: Observations on the collagen system. Nature 174: 853 (1954).

82.) - : zit. bei TELKKÄ, KULONEN[102].

83.) RANKE : zit. bei SCHWARZ[94].

84.) REED,R.: The architecture of the collagen fibril. In: Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957 p. 299.

85.) RILEY,J.F.: The mast-cells. Edinburgh 1959 p. 1.

86.) RIZZOLI,C.: Ricerche sulla natura e distribuzione dei mucopolisaccaridi nella cute. Dermatologica 103: 349 (1951).

87.) ROBB-SMITH,A.H.T. 1954: zit. bei GESCHICKTER u. Mitarb.[23]

88.) RÖSSING,P.: Das Encym Hyaluronidase, seine biologische, pathogenetische und klinische Bedeutung. Dt. Gesundheitswesen 7,2: 1153 (1952).

89.) SCHEIBE,G. 1938: zit. bei SYLVEN[100].

90.) SCHMID,K., ROSA,E.C. u. NAIR,M.B.: Fractionation of the proteins of human synovial fluid and plasma. J. Biol.Chem. 219: 769 (1956).

91.) SCHMIDT,W.J.: Instrumente und Methoden zur mikroskopischen Untersuchung optisch anisotroper Materialien mit Ausschluss der Kristalle. Handbuch der Mikroskopie in der Technik 1 Teil I: p. 149 (1956).

92.) SCHNEIDER u.a.: zit. bei LINDNER u. Mitarb.[56].

93.) SCHUBERT,M. u. LEVINE,A.: A conductimetric study of the interaction of anionic mucopolysaccharides and cationic dyes. J.Amer.Chem.Soc. 75,4: 5842 (1953).

94.) SCHWARZ,W.: Morphology and differentiation of the connective tissue fibres. Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, p.144.

95.) SHEPPHARD,S.E. 1942: zit. bei SYLVEN[100].

96.) SMITH u. Mitarb.: zit. bei GIBIAN[24].

97.) STAEMMLER,M.: Untersuchung über Vorkommen und Bedeutung der histiogenen Mastzellen im menschlichen Körper unter normalen und pathologischen Verhältnissen.
Frankf.Zeitschrift Path. 25: 391 (1921).

98.) STEMMERMANN,W.: Elektrophoretische Untersuchungen am Glaskörper von Mensch und Tier. Klin.Wschr. 30: 1103 (1952).

99.) SYLVEN,B.,AMBROSE,E.J.: Birefringent fibres of hyaluronic acid. Biochim.Biophys.Acta 18: 587 (1955).

100.) - : Metachromatic dye-substrate interactions. Quart. J.Microscop.Sci. 95: 327 (1954).

101.) - : zit. bei RILEY[85].

102.) TELKKÄ,A.,KULONEN,E.: On the effect of acid extraction and Hyaluronidase treatment of collagen on its standard stainings. Acta path. et microbiol.Scand. 35: 469 (1954).

103.) THIELE,H.: Ionotrope Gele-Modelle für das biologische Wachstum. Die Umschau in Wissenschaft und Technik. 4: 117 (1963).

104.) - ,HOPPE,K.,MOLL,G.: Über das kolloide Gold. Schutzwirkung von Polyelektrolyten. Kolloid-Zschr. 185: 45 (1962) Heft 1.

105.) - ,PLOHNKE,K.,BRANDT,E.,MOLL,G.: Ordnen von Polyelektrolyten durch Ionendiffusion. Kolloid-Zschr. 182: 24 (1962) Heft 1-2.

106.) THONARD,J.C.,SCHERP,H.W.: Resistance of human gingival collagen to human gingival bacteria. Proc.Soc. Exp.Biol. and Med. 96: 165 (1957).

107.) VERZAR,F.: Das Altern des Kollagens. Helv.Physiol. Acta 14: 207 (1956).

108.) WASSERMANN,F.: The intercellular components of connective tissue: origin,structure and interrelationship of fibres and groundsubstance. Ergeb.Anat.Entwickl. Gesch. 35: 240 (1956).

109.) - : 1929: zit. bei WASSERMANN[108].

110.) - : Die Feinstruktur des Bindegewebes in gegenwärtiger Sicht als Grundlage der Funktionen und der pathologischen Veränderungen. Verhandl.Kongr. Innere Med. 65: 852 (1959).

111.) WATSON,E.M.,PEARCE,R.H.: The cutaneous mucopolysaccharides in localized (pretibial) myxedema. Ann.New York Acad.Sci. 52: 1004 (1950).

112.) WERLE,E.,AMANN,R.: Zur Physiologie der Mastzellen als Träger des Heparins und Histamins. Klin.Wschr. 34: 624 (1956).

113.) WINTERSTEIN,A. 1954: zit. bei WERLE,AMANN[112].

114.) WÖLBACH,B. 1933: zit. bei WASSERMANN[110].

115.) WOLFROM,M.L. 1950: zit. bei WERLE,AMANN[112].

116.) - ,SHEN,T.M.,SUMMERS,C.G.: Sulfated nitrogenous polysaccharides and their anticoagulant activity. J.Amer.Chem.Soc. 75,1: 1519 (1953).

117.) WOLPERS,C.: Kollagenquerstreifung und Grundsubstanz. Klin.Wschr. 22: 624 (1943).

L e b e n s l a u f

Am 30. August 1940 wurde ich, Brigitte S t r o h - m a i e r , als Tochter des Oberverwaltungsrats Karl Strohmaier und seiner Ehefrau Maria geb. Rilling in Reutlingen geboren. Nach Absolvierung der Volksschule trat ich 1950 in das Isolde-Kurz-Gymnasium in Reutlingen ein, an dem ich am 7. März 1959 das Abitur ablegte.

Mein vorklinisches Studium verbrachte ich in Tübingen. Nach der ärztlichen Vorprüfung im Oktober 1961 studierte ich 2 Semester in Wien. Anschliessend kehrte ich nach Tübingen zurück und legte im Dezember 1964 das medizinische Staatsexamen ab.